



**Instituto de Ganadería de Montaña (IGM)
Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) - Universidad de León
Departamento de Nutrición y Producción de Herbívoros**



**Universidad
Zaragoza**



**Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ)
Centro Internacional de Altos Estudios Agronómicos Mediterráneos (CIHEAM)**

Universidad de Zaragoza

Fundación Española para el Desarrollo de la Nutrición Animal (FEDNA)

MÁSTER INTERNACIONAL EN NUTRICIÓN ANIMAL

**Uso de harinas de insectos en la alimentación de
rumiantes: Valoración proteica y tratamiento con
taninos.**

**Mariana Gabriela González Rosales
2019**

Uso de harinas de insectos en la alimentación de rumiantes: Valoración proteica y tratamiento con taninos.

Memoria de la Tesis de Máster presentada por
Mariana Gabriela González Rosales

dirigida por
Dra. Pilar de Frutos Fernández
y Dr. Pablo Gutiérrez Toral

para la obtención del título de
Master of Science del CIHEAM en Nutrición Animal,
otorgado por el IAMZ-CIHEAM.

Zaragoza, julio de 2019

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, quiero expresar mi agradecimiento a mis padres y hermano, por el inmenso apoyo que me han brindado a lo largo de toda mi vida, ayudándome día a día con palabras de aliento y cariño para superar cualquier tipo de obstáculo que se ha ido presentado y así lograr cumplir mis metas.

A mis directores de tesis, Dra. Pilar de Frutos y Dr. Pablo G. Toral por permitirme formar parte de su equipo de investigación. Gracias por todo el apoyo que me han proporcionado a lo largo de este proceso, sin su conocimiento, orientación y paciencia este trabajo no hubiera sido posible.

De igual manera, quiero agradecer al Dr. Gonzalo Hervás que me ha brindado su conocimiento y tiempo para ayudarme a comprender aspectos del trabajo que hemos realizado, y al Dr. Álvaro Belenguer.

Un agradecimiento muy grande para Alex, Cris, Anto, Marga y María que con sus palabras y anécdotas me han animado durante mi estancia en León, al igual que para las personas que trabajan en finca que han hecho que el trabajo en las naves sea grato y divertido.

A mis mejores amigas Sandra, Sofía y Fernanda que a pesar de la distancia siempre han estado a mi lado dándome palabras de ánimo y apoyo para salir adelante durante todo el tiempo que he estado lejos de casa.

Para terminar, deseo manifestar mi agradecimiento al Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza por la oportunidad de permitirme realizar el máster en su institución y al Dr. Armando Occon Plazahola por su preocupación y ayuda durante todo el máster.

Deseo expresar nuestro agradecimiento al Instituto de Ganadería de Montaña (IGM; centro mixto del CSIC y la Universidad de León) por poner a nuestra disposición todos los medios materiales y humanos necesarios para la realización de este trabajo.

ÍNDICE GENERAL

	Página
AGRADECIMENTOS	I
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	IX
ABREVIATURAS	XIII
RESUMEN	XVII
SUMMARY	XXI
RÉSUMÉ	XXV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
1. Los insectos como alimento	7
1.1. Perfil nutricional de los insectos	8
1.1.1. <i>Tenebrio molitor</i>	9
1.1.2. <i>Zophobas morio</i>	10
1.1.3. <i>Alphitobius diaperinus</i>	10
1.1.4. <i>Acheta domesticus</i>	11
1.2. Producción de insectos. Beneficios y riesgos	12
1.3. Utilización de insectos en la alimentación de animales de producción	13
2. Valoración proteica en rumiantes	14
3. Taninos	17
3.1. Definición, clasificación y propiedades químicas	17
3.2. Los taninos en la alimentación de rumiantes	18
III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL	21
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	25
1. Animales experimentales	27
2. Experimento 1: Valoración proteica	27
2.1. Sustratos de incubación	27
2.2. Procedimientos	28
2.2.1. Cultivos <i>in vitro</i>	28
2.2.2. Incubaciones <i>in situ</i>	31
3. Experimento 2: Tratamiento con taninos	31
3.1. Degradación ruminal <i>in situ</i>	32
3.2. Digestibilidad intestinal <i>in vitro</i>	32
4. Análisis químicos	33
4.1. Composición química de los alimentos o de los residuos de las incubaciones	33

4.2. Análisis de amoniaco	33
4.3. Análisis de taninos	34
5. Análisis estadísticos	34
5.1. Experimento 1: Valoración proteica	34
5.2. Experimento 2: Tratamiento con taninos.....	35
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
1. Composición química de los alimentos	39
2. Valoración proteica.....	41
3. Tratamiento con taninos	44
VI. CONCLUSIONES.....	53
VII. BIBLIOGRAFÍA	57

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Composición química del medio de cultivo	29
Tabla 2. Composición química (%) de los alimentos.....	39
Tabla 3. Contenido de fenoles totales y taninos totales de los alimentos (% MS).....	40
Tabla 4. Ecuaciones de regresión establecidas entre la producción de gas (x, mL) y el contenido de nitrógeno amoniacal (y, mg/l) tras 16 h de incubación <i>in vitro</i> de los alimentos proteicos con cantidades crecientes (0, 100, 200 o 300 mg) de almidón (n = 12).	41
Tabla 5. Degradación (g/g) del nitrógeno de los alimentos proteicos estimado mediante el método de Raab et al. (1983; DN reg), el método <i>in vitro</i> de cultivos no renovados de microorganismos ruminales (DN <i>in vitro</i>) o la técnica de las bolsas de nailon (DN <i>in situ</i>).....	43
Tabla 6. Degradación de la materia seca (DMS; g/g) y de la proteína bruta (DPB; g/g) tras 16 h de incubación ruminal y digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR; g/g) de los alimentos tratados o no con un 15% de taninos hidrolizables (ROB: roble) o condensados (QUE: quebracho).....	46
Tabla 7. Solubilidad (g/g) de los alimentos tratados o no con un 15% de taninos hidrolizables (ROB: roble) o condensados (QUE: quebracho).....	48
Figura 1. Representación gráfica de los datos mostrados en la Tabla 4.....	42
Figura 2. Representación gráfica de los datos de DPB mostrados en la Tabla 6.	49

DIPNDR	Digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en rumen
DMS	Degradación de la materia seca
DN	Degradación del nitrógeno
DN <i>in situ</i>	Degradación del nitrógeno <i>in situ</i>
DN <i>in vitro</i>	Degradación del nitrógeno <i>in vitro</i>
DN reg.....	Degradación del nitrógeno por regresión
DPB	Degradación de la proteína bruta
EE	Extracto etéreo
eed	Error estándar de la diferencia
FAD.....	Fibra ácido detergente
FND	Fibra neutro detergente
MO	Materia orgánica
MS.....	Materia seca
P.	Probabilidad (nivel de significación)
PB.....	Proteína bruta
PV.....	Peso vivo
PVPP.....	Polivinilpirrolidona
RMSE.....	Raíz cuadrada del error cuadrático medio
QUE.....	Taninos de quebracho
ROB	Taninos de roble
TMR.....	Ración completa mezclada (<i>total mixed ration</i>)

En la mayor parte de los sistemas intensivos de alimentación de rumiantes existe una gran dependencia de la torta de soja como fuente de proteína, lo que hace necesaria la búsqueda de alternativas. El empleo de insectos se ha sugerido como una de dichas alternativas, pero, hasta la fecha, existen muy pocos trabajos científicos que los caractericen. Una de las primeras necesidades al respecto es su valoración proteica. Sin embargo, el uso de las técnicas *in situ* de las bolsas de nailon o *in vitro* de cultivos no renovados de microorganismos ruminales han sido cuestionadas, por lo que sería preciso explorar otras posibilidades. Por otro lado, y dado que se desconoce aún cuán elevada puede ser la degradación ruminal de las harinas de insectos, nos planteamos el uso de taninos para poder limitarla y mejorar así su utilización digestiva. Por lo tanto, esta tesis de máster se llevó a cabo con dos objetivos principales: 1) realizar una valoración proteica de varias harinas de insectos mediante diversas técnicas (*in vitro* e *in situ*) y 2) estudiar si el uso de taninos podría reducir la degradación ruminal de la proteína de harinas de insectos sin afectar a su digestibilidad intestinal.

Para cumplirlos, se realizaron 2 ensayos. En el primero, se valoraron 4 harinas de insectos: 1) gusano de la harina (*Tenebrio molitor*); 2) gusano rey (*Zophobas morio*); 3) escarabajo de la cama (*Alphitobius diaperinus*), y 4) grillo doméstico (*Acheta domesticus*, adultos). Además, se utilizó torta de soja como alimento de referencia. Para la valoración proteica de estos alimentos se usaron 3 técnicas diferentes. En el primero, se siguió la metodología *in vitro* de cultivos no renovados de microorganismos ruminales con dosis crecientes de almidón y la degradación del N se estimó mediante regresión lineal (mL de gas vs. mg de N-amoniaco). El segundo consistió en la estimación de la degradación de N mediante el filtrado clásico tras la incubación *in vitro* y en el tercero se empleó la técnica *in situ* de las bolsas de nailon.

En el segundo experimento se evaluó el efecto del tratamiento de las 4 harinas de insectos con un 15% MS de un extracto comercial de taninos de roble o de quebracho y se comparó nuevamente con el efecto en la torta de soja. La degradación ruminal de la proteína se estudió mediante la técnica de las bolsas de nailon. A continuación, la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen se determinó usando una técnica *in vitro* basada en la incubación con pepsina y pancreatina.

Los análisis confirmaron el potencial de las harinas de insectos como ingredientes alternativos a las fuentes tradicionales de proteína. De los estudiados, *Z. morio* fue el que mostró una menor cantidad de PB (38%), aunque mayor proporción de grasa (49%). El que mayor contenido proteico presentó fue *A. domesticus* (70%). En cuanto a la valoración proteica, independientemente del método empleado, todos los insectos mostraron valores de degradación más bajos que la torta de soja, oscilando estos entre 0,406 en *T. molitor* y 0,778 en *A. diaperinus*. Las cifras fueron relativamente similares cuando se estimaron por regresión o *in situ*, pero más variables en la estimación *in vitro*, aunque los tres métodos parecen establecer un ranking similar entre alimentos. No obstante, sería conveniente realizar más valoraciones.

En cuanto al tratamiento con taninos, tanto el roble como el quebracho redujeron la degradación ruminal en todos los casos. Los descensos variaron entre el 10% en el grillo doméstico (*Acheta domesticus*) y el 19% en las larvas de gusano rey (*Zophobas morio*) y no se observó una relación evidente entre la magnitud de la respuesta y los contenidos de N de cada insecto o de su degradación en el tratamiento control. En lo que se refiere a la digestibilidad intestinal de la proteína, alta en todos los insectos, los valores fueron siempre mayores en el tratamiento con el extracto de roble que en el del quebracho y, sorprendentemente, también superiores que los del control en *Z. morio* y *A. diaperinus*. En todo caso, aunque nuestros resultados sugieren que el uso de taninos de roble podría resultar más ventajoso que el de taninos de quebracho, sería necesario realizar más experimentos, incluidas pruebas *in vivo*, para poder ratificarlo. También sería recomendable examinar la posibilidad de obtener efectos similares utilizando dosis más bajas o con taninos de menor pureza o de diferente origen, con el objetivo final de reducir los costes en condiciones prácticas de explotación.

SUMMARY

Most intensive ruminant feeding systems are highly dependent on soybean meal as the source of protein, which encourages to search for alternatives. The use of insects has been suggested as one of these alternatives, but to date there are very few scientific reports characterizing this type of feeds. Protein evaluation would be among the first needs in this regard. However, concerns exist about the use of methodologies such as the *in situ* nylon bag technique or batch cultures of ruminal microorganisms, and other possibilities must be explored. Furthermore, and given that the extent of ruminal degradation of insect meals is still unknown, we considered the use of tannins to try to limit it, thus improving its digestive utilization. This master thesis was therefore performed with two main objectives: 1) to conduct a protein evaluation of several insect meals using different techniques (*in vitro* and *in situ*) and 2) to study if the use of tannins could reduce the ruminal degradation of insect meal protein without affecting its intestinal digestibility.

On this basis, 2 trials were performed. In the first experiment, 4 insect meals were studied: 1) mealworm (*Tenebrio molitor*); 2) morioworm (*Zophobas morio*); 3) buffaloworm (*Alphitobius diaperinus*), and 4) domestic cricket (*Acheta domesticus*, adults). In addition, soybean meal was used as a reference feed. The protein evaluation of these meals was conducted using 3 different techniques. First, *in vitro* batch cultures of ruminal microorganisms were carried out with increasing levels of starch, and N degradation was estimated by linear regression (mL of gas vs. mg of ammonia-N). The second methodology consisted in estimating N disappearance by filtering the *in vitro* incubation residue, whereas the third approach involved the *in situ* nylon bag technique.

In the second experiment, the effect of treating the 4 insect meals with 15% dry matter of commercial extracts of oak or quebracho tannins was evaluated and compared again with the effect on soybean meal. The ruminal degradation of the protein was studied using the nylon bag technique. Then, the intestinal digestibility of the non-degraded protein of each substrate was determined applying the *in vitro* method based on the incubation with pepsin and pancreatin.

The analyses confirmed the potential of insect meals as alternative ingredients to traditional sources of protein. Among those examined, *Z. morio* showed the lowest content of crude protein (38%), but the greatest proportion of fat (49%). The highest

protein percentage was found in *A. domesticus* (70%). Regardless of the protein evaluation method, all insect meals showed lower degradations than soybean meal, ranging from 0.406 in *T. molitor* to 0.778 in *A. diaperinus*. Results were relatively similar in estimations based on regression or *in situ* techniques, but a higher variation was observed in the *in vitro* assessment, even though the three methodologies seem to establish a similar ranking among feeds. Anyhow, further evaluations would be advisable.

Regarding tannin treatment, both oak and quebracho reduced the ruminal degradation in all cases. Decreases varied between 10% in the domestic cricket (*Acheta domesticus*) and 19% in the morioworm (*Zophobas morio*) and no apparent relationship was observed between the magnitude of the response and the N content of each insect or its degradation in the control. Regarding the intestinal digestibility of the protein, high values were observed for all insects, being higher after the treatment with oak tannins than with quebracho tannins for all of them and, surprisingly, also than in the control for *Z. morio* and *A. diaperinus*. In any event, although our results suggest that the use of the oak extract could be more advantageous than that of quebracho, additional research must be conducted to confirm this observation, particularly *in vivo*. It would also be advisable to examine the possibility of obtaining similar effects with lower tannin doses, extracts of lower purity or from different origins, with the goal of reducing costs under practical conditions.

Dans la plupart des systèmes intensifs, l'alimentation des ruminants est fortement dépendante de l'utilisation du tourteau de soja comme source de protéines, ce qui rend nécessaire la recherche d'aliments protéinés alternatifs. L'utilisation de la farine d'insectes a été suggérée comme l'une de ces alternatives, mais à ce jour, très peu de travaux scientifiques ont caractérisé ces aliments. L'évaluation de la valeur des protéines serait l'un des premiers besoins à cet égard. Toutefois, l'emploi des techniques des sacs en nylon *in situ* ou des cultures discontinues de microorganismes ruminiaux *in vitro* est remise en question. Par ailleurs, l'ampleur de la dégradation ruminale des farines d'insectes est inconnue. C'est pourquoi, l'utilisation de tanins a été envisagée dans ces travaux afin de la limiter, et ainsi, améliorer l'utilisation digestive. Par conséquent, deux principaux objectifs composent cette thèse de maîtrise: 1) évaluer la digestibilité de la protéine de certaines farines d'insectes à l'aide de différentes techniques (*in vitro* et *in situ*), et 2) évaluer l'efficacité des tanins à réduire la dégradation ruminale de la protéine sans affecter sa digestibilité intestinale.

Pour ce faire, deux essais ont été réalisés. Dans le premier, la digestibilité de la protéine de quatre farines d'insectes a été étudiée en comparaison avec le tourteau de soya (aliment de référence), soit celle du 1) ver de farine (*Tenebrio molitor*), 2) ver morio (*Zophobas morio*) 3) ver buffalo (*Alphitobius diaperinus*) et 4) grillons domestiques (*Acheta domesticus*, adultes). Trois techniques d'analyses ont été utilisées. La première utilisait des cultures discontinues de microorganismes ruminiaux *in vitro* en combinaison avec des doses croissantes d'amidon. Le N dégradé a par la suite été estimée à l'aide d'une régression linéaire (mL de gas vs. mg de N-amoniacal). La seconde consistait à estimer la disparition du N au moyen de la filtration classique suite à une incubation *in vitro*. Enfin la troisième technique utilisée était celle des sacs en nylon *in situ*.

Pour la deuxième expérimentation, les cinq sources de protéines ont été traitées avec des extraits commerciaux de tanins de chêne (ROB) ou de quebracho (QUE) à 0 (témoin) ou 15% de la MS et ont été incubés *in situ* pendant 16 h. La dégradation de la protéine dans le rumen a été évaluée avec la technique des sacs en nylon, puis la digestibilité intestinale de la protéine non dégradée dans le rumen a été déterminée à l'aide de la technique d'incubation *in vitro* avec de la pepsine et de la pancréatine.

Les résultats ont confirmé le potentiel des farines d'insectes à substituer les aliments protéinés traditionnels. Parmi les espèces étudiées, *Z. morio* était celle qui présentait la plus faible quantité en PB (38%), mais une proportion plus importante de matières grasses (49%). La plus haute teneur en protéines a été obtenue pour *A. domesticus* (70%). En ce qui concerne l'évaluation de la digestibilité des protéines, quelle que soit la méthode utilisée, toutes les farines d'insectes présentaient des valeurs de dégradation inférieures à celles du tourteau de soja, allant de 0,406 pour *T. molitor* à 0,778 pour *A. diaperinus*. Les valeurs estimées par régression ou bien *in situ* étaient similaires, tandis qu'il y avait davantage de variations dans les estimations *in vitro*. Néanmoins, les trois méthodes ont établi un classement similaire entre les aliments. D'autres recherches seraient requises pour confirmer ces résultats.

En ce qui concerne le traitement avec les tanins, ROB et QUE ont tous deux réduit la dégradation ruminale de toutes les farines. Les diminutions ont varié de 10% pour *A. domesticus* à 19% pour *Z. morio*. Aucune relation n'a été observée entre l'amplitude de réponse et le contenu de N de chacune des farines d'insectes ou bien avec la dégradation dans le témoin. En ce qui concerne la digestibilité intestinale des protéines, elle fût élevée dans tous les traitements. Les valeurs étaient toujours plus grande pour le traitement ROB que QUE. De plus, il est intéressant de constater que pour les espèces *Z. morio* et *A. diaperinus*, ROB présentait une meilleure digestibilité même en comparaison avec les traitements sans tanins. Dans tous les cas, même si les résultats suggèrent que l'utilisation des tanins de chêne pourrait être plus avantageux que les tanins de quebracho, d'autres expérimentations sont nécessaires, particulièrement *in vivo*, afin de confirmer ces résultats. Il serait également pertinent d'examiner si des doses plus faibles, une qualité inférieure ou une origine différente des extraits de tanins permettent d'obtenir des effets similaires, avec l'objectif ultime de réduire les coûts d'alimentation dans des conditions pratiques.

I. INTRODUCCIÓN

En la mayor parte de los sistemas intensivos de alimentación de rumiantes existe una gran dependencia de la torta de soja como fuente de proteína. Dicha dependencia es especialmente elevada en Europa debido a la prohibición del uso de harinas de carne y sus derivados en la alimentación de rumiantes, lo que obliga al empleo, casi exclusivo, de fuentes de proteína vegetal (Van Huis et al., 2013; Mavromichalis, 2018).

Por lo tanto, se hace necesaria la búsqueda de fuentes alternativas que puedan utilizarse en la producción animal. Aunque los insectos se han sugerido como alternativa a las proteínas vegetales tradicionalmente utilizadas en los piensos (Van Huis et al., 2013; Makkar et al., 2014; Boloh, 2018), hasta la fecha existen muy pocos trabajos científicos en los que se haya caracterizado en rumiantes este tipo de alimentos proteicos (Jayanegara et al., 2017a, 2017b, 2017c; Rashmi et al., 2018).

Uno de los principales inconvenientes de los insectos, como alimento, es que son extremadamente heterogéneos (no sólo por la especie de insecto sino también por su fase metamórfica), especialmente en lo que se refiere a la cantidad y calidad de su proteína o grasa (Rumpold y Schlüter, 2013a).

Además, el uso de las técnicas *in situ* de las bolsas de nailon (Ørskov y McDonald, 1979) o *in vitro* de cultivos no renovados de microorganismos ruminales (Williams, 2000) para evaluar la degradación ruminal de la proteína ha sido cuestionado en diversas ocasiones, ya que podría haber una sobreestimación por el paso de partículas a través de los poros (bien del crisol o bien de las bolsas) sin ser realmente degradadas (Givens et al., 2000). Para evitar este problema, Raab et al. (1983) propusieron un método alternativo basado en la técnica de producción de gas. Sin embargo, a juzgar por las pocas publicaciones existentes al respecto (e. g., Mota et al., 2005), esta propuesta no parece haber recibido demasiada atención.

Por otro lado, varios autores han demostrado que los taninos pueden reducir la degradación ruminal de la proteína de la dieta y mejorar así el aporte de aminoácidos susceptibles de ser absorbidos en el intestino. Los taninos son un grupo muy heterogéneo de compuestos secundarios de las plantas que aparecen ampliamente distribuidos en la naturaleza. Durante muchos años, se consideraron factores antinutricionales, porque se les atribuía un efecto negativo relacionado

fundamentalmente con su reducción de la palatabilidad de los alimentos, y consecuente menor ingestión, así como con una menor digestibilidad de la dieta (Makkar, 2003). Sin embargo, hace tiempo que se sabe que estos efectos dependen tanto del tipo de tanino como de la dosis consumida (Frutos et al., 2004a; Mueller-Harvey, 2006) y pueden ser usados para mejorar la utilización de la dieta.

En este sentido, Frutos et al. (2000) y Hervás et al. (2000) demostraron que el empleo de un extracto comercial de taninos de quebracho o el ácido tánico permitían reducir la degradación de la proteína de la torta de soja.

Dado que se desconoce aún cuán elevada será la degradación ruminal de los insectos, su protección podría ser de interés para su empleo en alimentación animal. Sin embargo, nosotros no hemos encontrado ninguna publicación sobre el uso de estos compuestos fenólicos para proteger harinas de insectos.

Así pues, aunque los objetivos concretos de esta tesis se especificarán en un capítulo posterior, podemos adelantar, para cerrar la Introducción, que este trabajo se llevó a cabo para 1) realizar una valoración proteica de varias harinas de insectos mediante la utilización de técnicas *in vitro* e *in situ*, y 2) estudiar si el uso de taninos podría reducir la degradación ruminal de la proteína de harinas de insectos sin afectar negativamente a su digestibilidad intestinal.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. LOS INSECTOS COMO ALIMENTO

El crecimiento constante de la población mundial está provocando una presión cada vez mayor sobre los sistemas ganaderos, comprometiendo su capacidad para asegurar la seguridad alimentaria (es decir, la disponibilidad asegurada de alimentos nutritivos y seguros) a escala global (Smith y Gregory, 2013; FAO, 2018). A ello se suma la amenaza del cambio climático, con una posible disminución de las tierras aptas para el cultivo, entre las que se incluyen las destinadas a la producción de los alimentos utilizados actualmente en la fabricación de piensos para el ganado. La competición con los cultivos industriales destinados a la producción, por ejemplo, de biodiesel, es otro de los motivos que hacen peligrar la sostenibilidad de los sistemas ganaderos actuales. En este contexto, se están buscando nuevas estrategias de alimentación animal que permitan mantener o mejorar la productividad al mismo tiempo que se reduce la competencia por los recursos disponibles. La utilización de insectos es una de las que está despertando más interés en los últimos años (Rumpold y Schlüter, 2013b; Makkar et al., 2014; PROteINSECT, 2016)

La entomofagia o ingestión de insectos y arácnidos es una práctica que se ha realizado desde los inicios de la humanidad y que, en ciertas partes del mundo, como Asia, África y algunos países de Latinoamérica, aún sigue siendo habitual (Van Huis et al., 2013). La FAO cataloga los insectos como alimentos ricos en proteína de alta calidad para los humanos y hace hincapié en los posibles beneficios ambientales de su producción, pero la aprensión y rechazo de muchos consumidores constituyen un importante freno para su consumo a gran escala, principalmente en los países occidentales (Ghaly y Alkoaik, 2009; Van Huis et al., 2013; Makkar et al., 2014). No obstante, una encuesta realizada en el marco del proyecto europeo PROteINSECT (2016) demostró que ese rechazo disminuye drásticamente cuando se plantea el uso de insectos en la alimentación del ganado y, así, un 73% de los encuestados afirmó estar dispuesto a comer animales de granja que hubieran recibido insectos en su dieta. Además, casi dos tercios de los encuestados respondió que, en su opinión, esta estrategia nutricional era de bajo o nulo riesgo para los consumidores, mientras que menos del 50% dio la misma valoración a la inclusión de vegetales modificados genéticamente en la dieta del ganado. Esto sugiere que, aunque queda mucho camino

por recorrer para que la entomofagia se considere una práctica habitual en los países occidentales, su uso en alimentación animal podría ser mucho más fácilmente aceptada.

1.1. Perfil nutricional de los insectos

Los insectos son un grupo animal muy variado y su composición química depende de la especie y etapa de desarrollo (huevos, larvas, ninfas, pupas y adultos), así como la alimentación que reciben (Rumpold y Schlüter, 2013a; Makkar et al., 2014; Oonincx et al., 2015). La mayor parte de los insectos comestibles pertenecen a los órdenes Coleóptera (escarabajos), Lepidoptera (orugas), Hymenoptera (hormigas y abejas) y Orthoptera (grillos, saltamontes y langostas), siendo gran parte de ellos consumidos en la etapa larvaria (Van Huis et al., 2013). Realizar una descripción exhaustiva del valor nutricional de todos estos insectos estaría fuera del alcance de este trabajo, de modo que esta revisión se centrará en algunas de las principales especies disponibles actualmente en el mercado español (i. e., *Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*, *Alphitobius diaperinus* y *Acheta domesticus*).

No obstante, como generalidades, cabe destacar que los insectos constituyen fuentes ricas en proteína, con contenidos que podrían superar el 50-60% de la MS (Barker, 1995; Makkar et al., 2014; Alves et al., 2016). En cuanto a su perfil de aminoácidos, algunas especies tienen contenidos limitados de metionina, triptófano, lisina y, en ciertos casos, de histidina (Finke, 2005; Makkar et al., 2014; Sánchez-Muros et al., 2014).

Su proporción de lípidos es muy variable, con un rango que va desde menos del 5% hasta más del 50% (EFSA, 2015). De igual forma, el perfil de sus ácidos grasos puede cambiar enormemente en función de la especie y el estadio de desarrollo (Rumpold and Schlüter, 2013a; Makkar et al., 2014; Gosh et al., 2017). En este sentido, la alimentación que reciben los insectos también es un factor que puede influir en gran medida en la composición de su fracción lipídica. Así, por ejemplo, se ha demostrado que es posible multiplicar el contenido de ácidos grasos poliinsaturados n-3 en las larvas de mosca soldado negra (*Hermetia illucens*) mediante la inclusión de harina de pescado en su dieta (Barroso et al., 2017).

Los niveles de fibra de los insectos pueden llegar a ser considerables en algunas ocasiones, sobre todo en la fase adulta, por la contribución de su exoesqueleto rico en quitina (Finke, 2005; Rumpold and Schlüter, 2013a; Sánchez-Muros et al., 2014). Tal y como recoge el informe de la EFSA (2015) sobre los riesgos del consumo de insectos, la presencia de quitina no solo puede reducir la digestibilidad de la proteína de los insectos, sino que también estaría relacionada con algunos casos de alergias. Para evitar ambos inconvenientes, es posible eliminar el exoesqueleto de los insectos durante su procesado.

Del contenido en micronutrientes de los insectos podría mencionarse como generalidad que contienen niveles de calcio bajos, pero pueden ser buenas fuentes de fósforo, hierro, zinc, manganeso, cobre y selenio (Makkar et al., 2014; EFSA, 2015).

1.1.1. *Tenebrio molitor*

Tenebrio molitor es una especie coleóptera autóctona de Europa, que actualmente se encuentra distribuida por todo el mundo y se conoce principalmente por su forma larvaria, el denominado gusano de la harina (Ghaly y Alkoaik, 2009). El tamaño de las larvas maduras es de aprox. 2-3 mm, aunque frecuentemente se trata con hormona juvenil para que superen los 20 mm. Aunque se consideraba una especie dañina por su crecimiento en lugares de almacenamiento de alimentos (principalmente cereales, que se contaminan con la presencia de exudados e insectos muertos), actualmente se trata de una de las más producidas de forma industrial, por su fácil cría (Ghaly y Alkoaik, 2009; Makkar et al., 2014). Su dieta natural se basa en cereales, pero son omnívoros y pueden alimentarse con todo tipo de material vegetal y productos de origen animal, teniendo el potencial de transformar desechos de baja calidad en alimento rico en proteína y energía en un periodo de tiempo relativamente corto (Ramos-Elorduy et al., 2002; Ghaly y Alkoaik, 2009).

Las larvas de *T. molitor* contienen valores generalmente elevados, aunque variables, de proteína bruta (20-69%) y de grasa (31-43%), siendo su contenido de cenizas generalmente menor del 5% y su relación calcio:fósforo muy baja (Makkar et al., 2014; Jonas-Levi y Martinez, 2017). Su proporción de aminoácidos esenciales se considera bueno y su disponibilidad adecuada, pudiendo verse favorecida por la presencia de tripsina en las larvas, además de por la ausencia de factores

antinutricionales como inhibidores enzimáticos de la tripsina y de la quimotripsina (Alves et al., 2016). Según recoge Finke (2002), contiene porcentajes bajos de ácido láurico (12:0; aprox. 0,5%) y elevados de ácido linoleico (18:2n-6; aprox. 27%), comparando con otros insectos criados de forma industrial.

1.1.2. *Zophobas morio*

Esta especie coleóptera pertenece a la misma familia que *T. molitor* (Tenebrionidae), pero se diferencia de este por el tamaño de las larvas, mucho mayores en el caso de *Z. morio* (aprox. 5 cm; Ramos-Elorduy et al., 2012). Su nombre común es gusano rey y procede de América del sur y central, donde suele crecer en la madera muerta o las cortezas de los árboles, aunque para su cría se emplean otros sustratos vegetales, como harinas y salvados, verduras o frutas (Ramos-Elorduy et al., 2012). Aunque su cría no es tan sencilla como la de *T. molitor* y su crecimiento es más lento, esta última característica presenta la ventaja de permitir un periodo de utilización de las larvas más flexible. Es una especie que se viene aprovechando en gran medida para la alimentación de animales insectívoros de compañía y de zoológico (Schulte, 1996; Ramos-Elorduy et al., 2012; Van Huis et al., 2013).

En cuanto a su composición nutricional, su proporción de proteína puede llegar a superar el 50% de la MS, si bien con niveles de aminoácidos azufrados limitados (Finke, 2002; Jabir et al., 2012; Yi et al., 2013). Su contenido de grasa supera normalmente el 34% de la MS, con altos niveles de ácido linoleico y, especialmente, de oleico (Finke, 2002; Jabir et al., 2012; Ramos-Elorduy et al., 2012). En general, posee cantidades bajas de cenizas (<4% de la MS), fibra bruta y FND (<10%), así como de algunas vitaminas, como por ejemplo la A, B₁₂ y E (Finke, 2002; Ramos-Elorduy et al., 2012).

1.1.3. *Alphitobius diaperinus*

Alphitobius diaperinus es una especie coleóptera denominada comúnmente escarabajo de la cama o, en su forma larvaria, gusano búfalo. Pertenece a la familia Tenebrionidae, como las dos anteriores, y es conocido por su potencial de causar plagas en almacenes de cereales y provocar problemas sanitarios en explotaciones avícolas, ya que puede ser vector de algunos patógenos animales (Cecco et al., 2005; Dinev, 2013). Se trata de una especie criada con frecuencia como fuente de alimento para reptiles,

aves y peces domésticos, así como una de los primeros insectos en criarse de forma industrial para su consumo humano en países occidentales, como por ejemplo Holanda (Van Huis et al., 2013).

Una de las razones que explican el interés actual por la cría de *A. diaperinus* es su elevado porcentaje de proteína bruta, que varía aproximadamente entre el 49 y el 60% (Yi et al., 2013; Adámková et al., 2016; Janssen et al., 2017). Las cantidades de aminoácidos esenciales aportados por esta especie son relativamente altas, estando en un rango similar al encontrado en la torta de soja (Yi et al., 2013; Janssen et al., 2017). Su porcentaje de grasa se sitúa en torno al 20-29%, siendo sus principales ácidos grasos el palmítico, oleico y linoleico (Yi et al., 2013; Adámková et al., 2016; Janssen et al., 2017). Su contenido de carbohidratos no parece superar el 15% (Adámková et al., 2016; Janssen et al., 2017).

1.1.4. *Acheta domesticus*

El grillo doméstico, *Acheta domesticus*, es un insecto del orden Orthoptera que se encuentra distribuido por todo el mundo, pues se adapta fácilmente a distintos ecosistemas, incluidas zonas cálidas (Van Huis et al., 2013; Makkar et al., 2014). Es particularmente apto para la cría en cautividad, porque es omnívoro y crece adecuadamente con una amplia variedad de sustratos (Van Huis et al., 2013; Makkar et al., 2014). Anualmente puede dar de 6 a 7 generaciones y se utiliza con frecuencia en la alimentación de animales domésticos (por ejemplo, aves) y de humanos, siendo muy apreciado en el sudeste asiático (Barker, 1995; Van Huis et al., 2013; Makkar et al., 2014).

Su contenido de proteína bruta es generalmente alto y supera en ocasiones el 60%, aunque también se han descrito valores inferiores al 20% en algunos casos (Finke, 2002; Yi et al., 2013; Jonas-Levi y Martinez, 2017). Su porcentaje de grasa resulta menor que en las otras especies de insectos descritas en apartados anteriores, no superando en muchos casos el 20%, y siendo además más bajo en las ninfas que en los adultos (Finke, 2002; Yi et al., 2013; Oonincx et al., 2015). Como en *A. diaperinus*, sus principales ácidos grasos son el palmítico, oleico y linoleico (Oonincx et al., 2015). La proporción de carbohidratos parece generalmente baja, principalmente en las ninfas (Finke, 2002). Aunque contiene proporciones de calcio y fósforo menores que las de otros insectos, es

una especie particularmente rica en vitamina B₁₂ (Van Huis et al., 2013; Makkar et al., 2014).

1.2. Producción de insectos. Beneficios y riesgos

La cría de insectos a gran escala es un sector relativamente joven, de modo que los métodos aplicados en la actualidad se basan más en la experiencia de los propios productores que en prácticas descritas en la literatura científica (EFSA, 2015). Por lo general, las granjas de insectos son ambientes cerrados y controlados en cuanto a condiciones de temperatura y humedad, que necesitan poca cantidad de suelo. Comparando con algunos mamíferos domésticos como los cerdos o los rumiantes, los insectos muestran altas tasas de conversión del alimento, además de una menor demanda de agua y bajas emisiones de gases con efecto invernadero, lo que podría hacerlos especialmente interesantes desde el punto de vista ambiental (Premalatha et al., 2011; Van Huis et al., 2013). La cría de insectos puede tener beneficios sociales por la diversificación de los medios de vida y la contribución a la seguridad alimentaria (Van Huis et al., 2013). Existen además especies de insectos que podrían ser especialmente útiles en cuestiones de biodegradación o bioconversión, al tener la capacidad de transformar residuos orgánicos, como el estiércol, en alimentos ricos en nutrientes de alta calidad, si bien los riesgos de este tipo de prácticas deben ser evaluados con mayor detalle (EFSA, 2015; Van Huis, 2019). En este sentido, el consumo de insectos no puede considerarse ausente de peligro y, por ello, su cría en algunas zonas del mundo, como la Unión Europea, está actualmente sometida a un control estricto en cuanto a qué sustratos es posible utilizar en su alimentación (p. ej., cereales, hortalizas, frutas...), lo que provoca que compitan con humanos y ganado por dichos recursos.

En un informe reciente, la EFSA (2015) detalla los riesgos asociados a la cría y procesamiento de los insectos. Existen en primer lugar peligros microbiológicos, ya que los insectos se procesan con todo o parte de su contenido intestinal, donde puede haber algunas especies microbianas potencialmente patógenas. Aunque se presupone que el procesamiento adecuado de los insectos (p. ej., deshidratación con calor) minimiza el riesgo de transmisión de enfermedades por esta vía (Van Huis et al., 2013; EFSA, 2015), serían necesarios más estudios al respecto.

Algunas especies de insectos producen sustancias químicas tóxicas como mecanismo de defensa y aquellos recolectados directamente de la naturaleza pueden estar contaminados con pesticidas y otros contaminantes (Rumpold y Schlüter, 2013a). No obstante, ambos peligros pueden evitarse en la cría comercial, usando especies inocuas en el primer caso y prescindiendo del uso de sustratos contaminados en el segundo (Van Huis, 2019).

Otro aspecto de importancia y del que aún se conoce poco, es el papel de los insectos en la transmisión de enfermedades priónicas. A priori, se descarta que los priones de mamíferos puedan replicarse en los insectos, pero hay estudios que sugieren que podrían ser vectores mecánicos de priones infecciosos (Lupi, 2006), de ahí que se evite la utilización de sustratos de origen humano y rumiante para su producción (EFSA, 2015).

Por último, y aunque no está directamente relacionado con el sistema de producción de los insectos, convendría destacar su conocida alergenicidad para algunas personas, con un mecanismo aparentemente similar al descrito para otros invertebrados (como algunas especies de marisco), si bien no cabe esperar que esto suponga un problema para los animales de granja (EFSA, 2015).

1.3. Utilización de insectos en la alimentación de animales de producción

La utilización de insectos en la alimentación animal se ha sugerido como una de las posibles soluciones para hacer frente al aumento de la demanda de carne, leche y pescado en las próximas décadas, reduciéndose la competición con los humanos y la industria de los combustibles por el uso de otros productos (Van Huis et al., 2013; Makkar et al., 2014). A priori, el mayor interés de los insectos en el sector ganadero sería su aprovechamiento como fuentes ricas de proteína, principalmente en aquellos países donde la mayor parte de los alimentos proteicos proceden de la importación (hasta un 70% en el caso de la Unión Europea; PROteINSECT, 2016).

No obstante, el número de publicaciones científicas sobre la utilización de insectos en los sectores ganadero es aún muy escaso. Enfocándose en las especies de insectos descritas en los apartados anteriores, cabe destacar que *Tenebrio molitor* se ha utilizado con buenos resultados en la alimentación de gallinas (siempre que se acompañe de una

suplementación con calcio) y de pollos, pudiendo sustituir parcialmente a la torta de soja y a la harina de pescado sin afectar negativamente al rendimiento productivo (Makkar et al., 2014). Por su parte, la adición del 25% de grillos domésticos a la dieta de pollos broiler permitió mejorar su índice de conversión, comparando con una dieta isoproteica basada en el uso de maíz y soja (Nakagaki et al. 1987). Aunque estos trabajos sugieren un buen potencial, se necesita avanzar en esta investigación para confirmar la idoneidad de estas estrategias nutricionales en condiciones prácticas, en otras especies, tipos de insectos y niveles de inclusión.

Sin embargo, en lo que se refiere a los rumiantes, la literatura científica es mucho más limitada. Así, por ejemplo, tres estudios publicados recientemente por el mismo grupo de investigación (Jayanegara et al., 2017a, 2017b, 2017c) han evaluado *in vitro* los efectos de la sustitución de la torta de soja por insectos, tales como larvas de *Tenebrio molitor* y *Hermetia illucens* o grillos campestres jamaicanos (*Gryllus assimilis*). Mediante la utilización de la técnica de Tilley y Terry (1963), estos autores mostraron que la digestibilidad de la MS de los insectos era menor que la de la torta de soja, pero resulta imposible dilucidar si ello se debe a diferencias en la utilización ruminal de los sustratos o en la digestión posterior, no siendo posible tampoco saber qué fracción o fracciones de los alimentos explica estos resultados.

En una revisión reciente (Sheikh et al., 2018), se recogen unos pocos trabajos más (algunos de difícil acceso) que sugieren que la harina de gusano de seda (*Bombyx mori*) podría representar una fuente de proteína muy prometedora para la alimentación de los rumiantes, debido a su aparentemente elevado porcentaje de proteína no degradable en el rumen, habiéndose probado con éxito como sustitución de otros ingredientes en la dieta de terneros y corderos.

2. VALORACIÓN PROTEICA EN RUMIANTES

La valoración de los alimentos que pueden ser potencialmente incluidos en la dieta de los rumiantes, en especial aquellos no convencionales como es el caso de los insectos, resulta de gran importancia a la hora de formular raciones equilibradas que permitan alcanzar los mejores rendimientos productivos. Los alimentos que son fuentes ricas de proteína determinan una parte importante del coste de las dietas, de ahí que haya existido desde hace décadas un elevado interés por su valoración, principalmente

enfocada a la fracción proteica (Tamminga, 1979; McDonald et al., 2006). Se trata, no obstante, de una tarea compleja, de ahí que aún no dispongamos actualmente de un único método de referencia que permita realizar de forma precisa, rápida, sencilla y económica la valoración proteica de la gran variedad de alimentos susceptibles de ser ofertados a los rumiantes (Hvelplund y Madsen, 1993; Mota et al., 2005; McDonald et al., 2006). En este sentido, las características concretas de cada producto o de cada estudio podrían influir a la hora de seleccionar la técnica más conveniente para realizar dicha evaluación.

Una de las metodologías más utilizadas en muchos laboratorios de nutrición animal es la comúnmente conocida como técnica *in situ* de las bolsas de nailon, que permite estimar el porcentaje de proteína de la dieta que es degradado por la acción de los microorganismos del rumen (Ørskov y McDonald, 1979; Ørskov et al., 1980). Para ello, se incuban muestras de los alimentos en el interior de bolsas de fibra sintética, permeable y con un tamaño de poro estandarizado, que se introducen en el rumen a través de una cánula. Finalizado el periodo de incubación, las bolsas se lavan y secan, pudiendo calcularse la cantidad de alimento (o de sus fracciones, como la proteína) que permanece en el interior como material no digerido. Dado lo extendido de su uso desde hace décadas, se ha hecho un esfuerzo por estandarizar la técnica y hacer comparables las medidas llevadas a cabo con distintos sustratos o en distintos laboratorios (Ørskov et al., 1980; Madsen y Hvelplund, 1994). Así, por ejemplo, si en una prueba se van a examinar distintos alimentos, es necesario que su procesado sea idéntico para eliminar las posibles diferencias debidas al tamaño de partícula (generalmente, se aconseja moler las muestras a 2 mm; Vanzant et al., 1998). Otras recomendaciones son la utilización de bolsas con un tamaño de poro entre 40 y 60 μm y una relación cantidad de muestra:superficie de bolsa de aprox. 10-20 mg/cm^2 (Nocek, 1988; Madsen y Hvelplund, 1994; Vanzant et al., 1998). También se aconseja que los animales estén en mantenimiento o que el aclarado de las bolsas incubadas incluya un lavado a máquina (Madsen y Hvelplund, 1994; Vanzant et al., 1998). A pesar de todo ello, se reconoce que esta técnica está sujeta a ciertas imprecisiones que no es posible controlar. En concreto, existen partículas de pequeño tamaño que pueden ser solubilizadas y abandonar las bolsas y el rumen sin ser realmente degradadas, lo que podría dar lugar a una

sobreestimación de los valores de degradación ruminal de la proteína (Givens et al., 2000; McDonald et al., 2006). La contaminación bacteriana del residuo es otra complicación adicional, especialmente en los ensayos de valoración proteica, de ahí que se hayan propuesto métodos para reducir o corregir la presencia de N microbiano (Nocek, 1988; Vanzant et al., 1998; McDonald et al., 2006).

Otra metodología que se encuentra entre las más utilizadas para la valoración proteica es una técnica *in vitro*, que se basa en la incubación de muestras del alimento con fluido ruminal tamponado, seguida de un filtrado del residuo de incubación a través de crisoles con un diámetro de poro normalizado (Williams, 2000). A continuación, se desecan el crisol más el residuo y este último se raspa para obtener la muestra sobre la que se analizará el contenido de N, para calcular la proporción que ha desaparecido respecto a la presente inicialmente en el sustrato. Como en el caso de la técnica *in situ*, su utilización habitual en numerosos laboratorios ha llevado a que se trate de un método relativamente estandarizado y se hayan realizado numerosos estudios de los factores que pueden afectar sus resultados, principalmente en cuanto se refiere al tipo de procesado previo de las muestras, preparación del medio de cultivo, recogida y preparación del inóculo, proporción inóculo:medio o corrección mediante el uso de blancos (Goering y Van Soest, 1970; Pell y Schofield, 1993; Williams, 2000; Hervás et al., 2005). No obstante, existen posibles fuentes de error inherentes al propio método, como la ligada a la variación en el proceso de raspado del residuo de los crisoles o, de forma muy similar a lo descrito previamente para el uso de las bolsas de nailon, la pérdida de pequeñas partículas que pasan a través de los poros sin haber sido degradadas (Givens et al., 2000). De igual manera, en esta metodología también podría existir una infravaloración de la degradación de N debido a la presencia de la proteína microbiana que se sintetiza durante incubación ruminal, lo que constituye otra limitación a tener en cuenta (Hvelplund y Weisbjerg, 1998; Givens et al., 2000).

Dentro de la búsqueda de metodologías alternativas que puedan permitir evitar los problemas asociados a las técnicas anteriores, Raab et al. (1983) propusieron un sistema de estimación mediante regresión. Para ello, a partir de la incubación *in vitro* de una cantidad fija de sustrato con fluido ruminal tamponado y cantidades crecientes de almidón, se realizan medidas paralelas de la producción de gas y de la concentración de

amoníaco en el residuo líquido de incubación. El amoníaco liberado durante la incubación se utiliza en parte para la síntesis de proteína microbiana, mientras que la producción de gas representa un reflejo de la energía disponible para la síntesis proteica. A partir de estos datos, la regresión lineal entre ambas variables permite estimar la degradación ruminal de la proteína. Aunque la aplicación de esta técnica parece relativamente poco extendida, Mota et al. (2005) sugirieron que podría ser una alternativa válida a la técnica *in vitro* descrita anteriormente, con la que guarda una elevada correlación en la valoración de forrajes tropicales. Otros autores la han aplicado a su vez para la caracterización tanto de forrajes de baja calidad como fuentes no convencionales de proteína (como las microalgas) y leguminosas y arbustos ricos en taninos (Getachew et al., 1998, 2000; Wild et al., 2019).

3. TANINOS

3.1. Definición, clasificación y propiedades químicas

Los taninos son un tipo de compuestos secundarios de las plantas, cuya variedad y complejidad impide definirlos de forma precisa desde el punto de vista bioquímico, de modo que suelen describirse como un grupo heterogéneo de compuestos fenólicos con pesos moleculares altos (>500 Daltons) y elevada afinidad por las proteínas, así como por otras moléculas, tales como polisacáridos, ácidos nucleicos, alcaloides y minerales (McLeod, 1974; Hervás, 2001). Entre sus propiedades químicas también cabe destacar su actividad antioxidante, reductora y quelante (ver la revisión de Doce, 2010).

Los taninos están ampliamente distribuidos en la naturaleza, incluyendo una gran variedad de plantas consumidas por los rumiantes (Khanbabaee y van Ree, 2001; Frutos et al., 2004a). Desde un punto de vista que tiende a la simplificación, aunque puede tener quizás cierta utilidad práctica, se clasifican en dos grandes grupos: condensados e hidrolizables. Los primeros, también llamados proantocianidinas, son los más frecuentes en el reino vegetal y están constituidos por polímeros no ramificados de hidroxiflavonoles. Su peso molecular es generalmente mayor que el de los hidrolizables, que se componen por su parte de ácidos fenólicos (principalmente ácidos gálico y elágico) unidos mediante enlaces éster a un núcleo compuesto por un carbohidrato. La principal característica de este segundo grupo de taninos es que pueden ser hidrolizados químicamente (por ácidos o bases) y de forma enzimática (McLeod, 1974; Hervás, 2001).

La heterogeneidad de los taninos en cuanto a sus estructuras repercute en sus propiedades químicas, incluyendo la habilidad para formar complejos con otras moléculas (Mueller-Harvey, 2006). Con las proteínas pueden formar uniones reversibles, que están determinadas por el grado de polimerización, la solubilidad y la flexibilidad conformacional de los taninos, así como por la composición en aminoácidos de la proteína o su conformación estructural y peso molecular (Asquith y Butler, 1986; Hervás, 2001). En este sentido, resulta de particular interés el efecto del pH sobre la firmeza de las uniones tanino-proteína, que se vuelven inestables y se disocian a valores por debajo de 3,5 y por encima de 8 (McLeod, 1974; Frutos et al., 2004a), lo que tiene implicaciones importantes en la nutrición de rumiantes, como se detallará en el siguiente apartado.

3.2. Los taninos en la alimentación de rumiantes

La producción de taninos parece ser un mecanismo de defensa químico de las plantas que sirve como método disuasorio para evitar su consumo excesivo por los herbívoros, de ahí que generalmente sean más abundantes en las partes más susceptibles de ser ingeridas, como las hojas jóvenes y las flores (Hervás, 2001; Doce, 2010). En ocasiones, el contenido de taninos puede ser suficientemente alto como para afectar al rendimiento productivo e incluso provocar intoxicaciones, de ahí que durante mucho tiempo se les considerara como tóxicos para los rumiantes (Mueller-Harvey, 2006; Doce, 2010). En este sentido, la disminución de la ingestión voluntaria de alimento es frecuentemente citada como una de las principales consecuencias del consumo de taninos (Makkar, 2003). No obstante, este problema solo se observa con dosis elevadas de los mismos, las cuales pueden perjudicar también a la fermentación ruminal, con efectos más o menos marcados en función de las propiedades químicas del tanino, la especie que los consuma, así como de la dieta basal y el estado nutricional del animal (Frutos et al., 2004a; Doce, 2010).

A pesar de todo lo anterior, actualmente se sabe que la ingestión de taninos puede ser beneficiosa para los rumiantes dependiendo, entre otros, del tipo y dosis de compuesto ingerido (McMahon et al., 2000; Frutos et al., 2004a; Mueller-Harvey et al., 2019). Así, existen abundantes estudios que señalan que el consumo de plantas ricas en taninos o extractos de los mismos puede tener efectos antihelmínticos, prevenir el meteorismo, mejorar la fertilidad, reducir las emisiones de metano y modular el

metabolismo de los ácidos grasos insaturados en el rumen (Toral et al., 2018; Mueller-Harvey et al., 2019). No obstante, quizás el beneficio más estudiado de los taninos sea su capacidad para proteger la proteína de los alimentos de la degradación ruminal, tal y como han demostrado numerosos autores (McMahon et al., 2000; Frutos et al., 2004a; Makkar, 2003).

Entre los mecanismos que explican la acción de los taninos sobre la proteína de la dieta destacaría la formación de complejos entre ambos compuestos. Estos complejos son estables a pH ruminal, protegiendo así a la proteína de la acción de los microorganismos del rumen, pero se pueden disociar posteriormente en las condiciones específicas del abomaso (pH: 2,5-3) y del duodeno (pH: 8; McLeod, 1974; Hervás, 2001). El posible efecto inhibitorio de los taninos sobre las enzimas microbianas (e. g., proteasas) y el crecimiento de los propios microorganismos (Jones et al., 1994; Mueller-Harvey, 2006) podría contribuir también a la reducción de la degradación ruminal de la proteína. Esta se ha observado de forma consistente en distintas especies, tales como ovejas y vacas, con el uso de taninos condensados e hidrolizables, así como en pruebas realizadas *in vitro* o *in situ* (McMahon et al., 2000; Frutos et al., 2004a). Así mismo, la respuesta se ve casi invariablemente reflejada en una menor concentración de nitrógeno amoniacal en el rumen (Hervás et al., 2003; Mueller-Harvey, 2006).

Los efectos de los taninos sobre otras fracciones del alimento, como la fibra, son menos consistentes. Tal y como se recoge en la revisión bibliográfica de la tesis doctoral de Doce (2010), se ha visto que la posible acción negativa de los taninos sobre la fermentación de la fibra podría explicarse por la formación de complejos con la celulosa, una peor adhesión de la microbiota a la pared celular, así como la inhibición de las celulasas y del crecimiento de los microorganismos celulolíticos.

En cuanto a los efectos post-ruminales de los taninos, muchos autores indican que estos polifenoles disminuyen la absorción de nutrientes en el intestino delgado, quizás por la persistencia de algunos complejos con los taninos a este nivel, la formación de complejos con las enzimas digestivas o por cambios en la permeabilidad de la mucosa intestinal (ver la revisión de Frutos et al., 2004a). No obstante, McSweeney et al. (1988) sugirieron que ciertos taninos también podrían aumentar la digestibilidad intestinal de la materia orgánica. En este sentido, tal y como ocurre a otros niveles, la dosis de tanino

podría determinar en gran medida la respuesta post-ruminal. Así, en sendos trabajos en los que se trató la torta de soja con ácido tánico o con un extracto comercial de taninos de quebracho, solo se redujo la digestibilidad intestinal de la proteína cuando se usaron dosis muy altas (Hervás et al., 2000; Hervás, 2001). En cualquier caso, si la reducción de este parámetro es moderada, podría llegar a compensarse por el aumento del flujo de proteína no degradada desde el rumen, mejorando con ello la retención de nitrógeno (Waghorn, 1996; Frutos et al., 2004a).

III. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

Este trabajo se llevó a cabo con dos objetivos principales:

1. Realizar una valoración proteica de varias harinas de insectos mediante la utilización de diversas técnicas (*in vitro* e *in situ*).
2. Estudiar si el uso de taninos podría reducir la degradación ruminal de la proteína de harinas de insectos sin afectar a su digestibilidad intestinal, y así mejorar su utilización digestiva.

Para cumplirlos, se realizaron 2 ensayos independientes.

En el primero, se valoraron 4 harinas de insectos: 1) gusano de la harina (*Tenebrio molitor*, larvas); 2) gusano rey (*Zophobas morio*, larvas); 3) escarabajo de la cama (*Alphitobius diaperinus*, larvas), y 4) grillo doméstico (*Acheta domesticus*, adultos). Además, se utilizó una torta de soja como alimento de referencia.

Para la valoración proteica de estos alimentos se usaron 3 métodos diferentes. En el primero, se siguió la metodología *in vitro* descrita por Raab et al. (1983) y Mota et al. (2005). Para ello, se realizaron cultivos no renovados de microorganismos ruminales usando ovejas merinas canuladas en el rumen como donantes del inóculo. Gracias a la incubación de dosis crecientes de almidón, la degradación del nitrógeno se estimó mediante regresión lineal (mL de gas vs. mg de N-amoniaco).

El segundo método consistió en la estimación de la degradación del N mediante el filtrado clásico tras la incubación *in vitro*.

La degradación ruminal del nitrógeno también se estudió mediante la técnica *in situ* de las bolsas de nailon (Ørskov y McDonald, 1979), como tercer método.

Como ya se ha mencionado, el segundo experimento se llevó a cabo para cumplir el segundo objetivo. En él se evaluó el efecto del tratamiento de las 4 harinas de insectos (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio*, *Alphitobius diaperinus* y *Acheta domesticus*) con taninos y se comparó nuevamente con el efecto en la torta de soja, como sustrato de referencia.

Los alimentos se trataron con un 15% de taninos, mediante la pulverización, y posterior secado, con una solución que contenía un extracto comercial de taninos de

roble (taninos hidrolizables) o de quebracho (taninos condensados). También se usó una solución libre de taninos como control.

En esta segunda prueba, la degradación ruminal del N se estudió mediante la técnica de las bolsas de nailon, manteniéndose estas en el rumen de las ovejas canuladas durante 16 horas. A continuación, la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen, de cada uno de los sustratos, se determinó mediante la técnica *in vitro* descrita por Calsamiglia y Stern (1995).

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

1. ANIMALES EXPERIMENTALES

Todos los procedimientos con animales se realizaron en la Nave de Experimentación de Rumiantes del Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE) de León, de acuerdo con el Real Decreto 53/2013 para la protección de animales utilizados para experimentación y otros fines científicos.

Tanto para las incubaciones *in situ* como para las *in vitro* (en este último caso, como donantes del inóculo ruminal) se utilizaron 4 ovejas adultas de raza merina (57,4 ± 8,16 kg PV), que no se encontraban ni gestantes ni en lactación, a las cuales se les equipó con una cánula ruminal.

Las ovejas se alojaron en un corral que disponía de comedero y bebedero con agua fresca a su disposición. Su alimentación consistió en una dieta mixta completa (TMR; MS 91,6%, PB 20,5%, FND 31,4%), constituida por alfalfa deshidratada, maíz y cebada en grano, torta de soja y vitaminas y minerales, con una relación forraje:concentrado 60:40. La TMR se ofertó a aprox. 1,1 veces sus necesidades energéticas de mantenimiento (INRA, 2007).

La dieta se administró durante un periodo de adaptación de 3 semanas antes de iniciarse el ensayo propiamente dicho, en una sola toma diaria (9:00 de la mañana). Los animales disponían también de paja ad libitum. Los posibles restos de TMR y paja se retiraban cada mañana, antes de ofertar nuevo alimento.

Los días que se llevó a cabo la incubación *in vitro*, y por tanto era necesaria la recogida de inóculo ruminal, a las ovejas se les administró la comida aprox. a las 9:00 h de la mañana, como el resto de los días, pero se les retiraron los restos a las 12:00 h y a partir de las 14:00 h se evitó también el consumo de agua. El inóculo se recogió aproximadamente a las 15-15:30 h.

2. EXPERIMENTO 1. VALORACIÓN PROTEICA

2.1. Sustratos de incubación

Como ya se ha indicado en el apartado de Objetivos y planteamiento experimental, como sustratos de incubación tanto para los cultivos *in vitro* como para las incubaciones *in situ* se utilizaron 4 tipos de harina de insectos deshidratados: gusano de la harina (*Tenebrio molitor*), gusano rey (*Zophobas morio*), larvas del escarabajo de

la cama (*Alphitobius diaperinus*) y adultos de grillo doméstico (*Acheta domestica*). Además, se incubó también torta de soja como alimento de referencia.

En cuanto a la procedencia de los insectos, *T. molitor* se obtuvo de *MealFood Europe* (Doñinos de Salamanca, España) y los otros tres de *Kreca Ento-Feed BV* (Ermelo, Holanda).

Los sustratos se molieron con nieve carbónica en un molino centrífugo (Retsch ZM 1000, Alemania) a 1 mm de tamaño para los cultivos *in vitro* o a 2 mm para las incubaciones *in situ*.

Su composición química, que se analizó como parte de este trabajo, se presenta en la sección de Resultados.

2.2. Procedimientos

2.2.1. Cultivos *in vitro*

Las incubaciones *in vitro* se llevaron a cabo mediante cultivos discontinuos de microorganismos ruminales y la técnica de producción de gas, tal y como se describe en Hervás et al. (2005).

En cada botella de incubación se habían pesado 500 mg MS de cada sustrato. Para poder llevar a cabo la valoración proteica propuesta por Raab et al. (1983) con las modificaciones recomendadas por Mota et al. (2005), a cada sustrato se le habían añadido 4 dosis de almidón de maíz (concretamente: 0, 100, 200 o 300 mg; Fluka 85652, España).

Antes de iniciar las incubaciones, se preparó el medio de cultivo (Goering y Van Soest, 1970, ver Tabla 1), cuya composición contenía soluciones tampón, reductora, de macrominerales, de microminerales y resazurina. La solución se mantuvo en un baño de agua a 39,5°C, gaseando con CO₂ durante 45 minutos aproximadamente, para asegurar su reducción.

El inóculo ruminal se recogió a través de la cánula de las ovejas, se filtró con 3 capas de gasas y se transportó en termos inmediatamente al laboratorio, conservando en la medida de lo posible sus condiciones de anaerobiosis y temperatura. Una vez en el laboratorio, los inóculos se volvieron a filtrar con una membrana de nailon (250 µm; Fisher-Scientific S.L., España), y en condiciones de anaerobiosis, es decir, bajo un flujo

de CO₂. Los inóculos procedentes de cada animal se mezclaron proporcionalmente para constituir un único inóculo por tanda (día) de incubación, y se combinaron con el medio de cultivo en una proporción 1:4 (v/v; fluido ruminal/medio de cultivo).

En cada botella de incubación de 125 ml se dosificaron 50 ml de la mezcla (10 ml inóculo ruminal + 40 ml medio de cultivo). Finalmente, las botellas se cerraron herméticamente con tapones de caucho y anillas de aluminio, se agitaron y se colocaron en un incubador (UFP 500; Memmert, Schwabach, Alemania) programado a 39,5°C.

Tabla 1. Composición química del medio de cultivo.

Soluciones (compuestos químicos)		Solución final (ml/l)	Concentración parcial (/l)
Solución tampón		208,1	
NH ₄ CO ₃	(g)		4,0
NaHCO ₃	(g)		35
Solución reductora		62,4	
Cisteína-HCl	(g)		6,25
NaOH 1M	(ml)		40
Na ₂ S 9H ₂ O	(g)		6,25
Solución de macrominerales		208,1	
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	(g)		9,45
KH ₂ PO ₄	(g)		6,20
MgSO ₄ 7H ₂ O	(g)		0,60
Solución de microminerales		0,104	
CaCl ₂ 2H ₂ O	(g)		1,32
MnCl ₂ 4H ₂ O	(g)		1,00
CoCl ₂ 6H ₂ O	(g)		0,10
FeCl ₃ 6H ₂ O	(g)		0,80
Solución de resazurina		1,04	
Resazurina	(g)		0,01

Las incubaciones se repitieron en 3 días diferentes (tandas) para disponer de réplicas estadísticas.

El número total de botellas fue el siguiente: [(5 sustratos × 3 botellas/sustrato) + 3 blancos] × 4 niveles de almidón × 3 tandas = 216 botellas.

La producción de gas se registró a las 4, 8 y 16 horas de incubación, utilizando un transductor de presión (Gems Sensors 2200, Hampshire, Reino Unido) conectado a una pantalla (Tracker 223; Data Tracker Process Instruments, Birmingham, Reino Unido). La

presión almacenada (medida en psi) se controló pinchando cada botella con una aguja de 0.6 mm de diámetro (Sterican B. Braun, España) que se conectaba al transductor.

Una vez realizada la medida, el transductor se retiraba de la aguja y esta se mantenía insertada unos segundos en cada botella para liberar el gas acumulado en la misma. Tras cada lectura, las botellas se agitaban una por una y se depositaban otra vez en el incubador hasta la próxima lectura.

A partir de los valores de presión corregidos para la cantidad de materia seca y para la producción de gas de los blancos, se estimó el volumen de gas producido mediante una ecuación de regresión lineal entre el volumen y la presión obtenida previamente a partir de numerosas medidas simultáneas de ambos parámetros (Hervás et al., 2005).

Transcurrido el tiempo establecido de la incubación (es decir, 16 h), las botellas se sumergieron en agua y hielo picado para detener la fermentación.

A continuación, se tomaron aproximadamente 8 ml del fluido ruminal tamponado en tubos de 10 ml de capacidad y se centrifugaron (3000 rpm, 10 min, 4°C, Eppendorf 5415C, España) para eliminar cualquier partícula en suspensión. Cuatro ml del sobrenadante de cada tubo se acidificaron con 4 ml de HCl 0,2 N y se almacenaron a -30°C hasta su posterior análisis de amoniaco. Estos análisis servirían para estimar la degradación del nitrógeno por regresión, que en el apartado de Resultados y Discusión aparecerá como DN reg.

En el caso de las botellas que no contenían almidón, los restos de los tubos de centrifugación (que contenían todas las partículas sólidas) se devolvieron a las botellas originales y todo el contenido de estas se filtró utilizando crisoles de porosidad 1 (100-160 µm; Pyrex, Reino Unido) y una bomba de vacío (Gast Manufacturing Inc. EE. UU.); cuando fue necesario, se usó también un baño de ultrasonidos (P-Selecta, España).

La degradación de la materia seca (DMS) se estimó introduciendo los crisoles en una estufa de aire forzado a 103°C durante 24 horas. Después, sobre el residuo, se analizó también el contenido de nitrógeno, para estimar así la degradación del nitrógeno *in vitro* (que en el apartado de Resultados y Discusión figurará como DN *in vitro*).

2.2.2. Incubaciones *in situ*

Para estimar la degradación ruminal del N se empleó también la técnica de las bolsas de nailon (Ørskov y McDonald, 1979). Para ello, se usaron bolsas de 50 µm de tamaño de poro (R1020, Ankom Technology Corp., EE. UU.) que fueron incubadas durante 16 horas en el rumen de las 4 ovejas canuladas antes descritas. En las bolsas, que primero se pesaron vacías y secas, se añadieron 6 g MS del sustrato a estudiar. El extremo abierto se cerró con una goma elástica e hilo de nailon, dejando un cabo libre de unos 30 cm de longitud para atarlo a la anilla que se encuentra en el tapón de la cánula ruminal. Las bolsas se introdujeron a través de la cánula, de modo que quedasen suspendidas del tapón y pudieran moverse libremente en el rumen.

Se incubaron 5 bolsas en cada animal (5 sustratos × 1 bolsa/sustrato × 4 animales). Transcurrido el tiempo de incubación (16 horas), se extrajeron y se lavaron a mano con agua fría. Después, se congelaron a -20°C durante un mínimo de 24 h para facilitar el posterior desprendimiento de los microorganismos ligados a las partículas de alimento.

Luego las bolsas se descongelaron, se lavaron en una lavadora automática con un programa en frío de 20 minutos de duración y, a continuación, se secaron en una estufa a 45°C durante 48 h. Pasado este tiempo, las bolsas se pesaron para poder estimar la degradación de la materia seca. Sobre el residuo se analizó el contenido de nitrógeno para poder estimar así su degradación (en el apartado de Resultados y Discusión, esta medida aparecerá como DN *in situ*).

3. EXPERIMENTO 2. TRATAMIENTO CON TANINOS

En este estudio se analizó el efecto del tratamiento de las harinas de insectos usadas en el primer ensayo con extractos comerciales de dos tipos de taninos:

- 1) extracto de taninos de roble (ROB, taninos hidrolizables, >65% de taninos)
- 2) extracto de taninos de quebracho (QUE, taninos condensados, ≥69% de taninos).

El ensayo incluyó también el tratamiento de la torta de soja, como alimento de referencia.

La dosis de taninos añadida a los alimentos fue del 15% MS. Para ello, 50 g de cada sustrato, molidos a 2 mm, se trataron con 30 ml de agua destilada que contenía 7,5 g

del extracto de roble o del extracto de quebracho. Además, para preparar los alimentos “control”, los sustratos se pulverizaron solo con agua (es decir, sin taninos). Todos ellos se secaron a continuación en una estufa a 45°C durante 48 horas.

3.1. Degradación ruminal *in situ*

Para estimar la degradación ruminal del N de los alimentos tratados o no con taninos se empleó la técnica de las bolsas de nailon, tal y como se ha descrito en el Experimento 1.

Las bolsas con los alimentos control, quebracho y roble, se incubaron en diferentes días para evitar interacciones entre los tratamientos. Cada día de incubación, se incubaron 5 bolsas por animal [total de bolsas = 60; [(5 sustratos × 1 bolsa/sustrato × 4 animales) × 3 tratamientos experimentales].

También se estimó la solubilidad (tanto de la MS como de la PB) de cada uno de los sustratos. Para ello, se utilizaron 2 bolsas de cada alimento que se lavaron, secaron y analizaron de forma similar a las incubadas en el rumen, pero prescindiendo de dicha incubación.

3.2. Digestibilidad intestinal *in vitro*

La digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen se determinó siguiendo la técnica *in vitro* desarrollada por Calsamiglia y Stern (1995).

Como sustratos se utilizaron los residuos obtenidos de la incubación *in situ*. De cada muestra se pesaron 15 mg de nitrógeno en tubos de polipropileno, añadiendo 10 ml de una solución de HCl 0,1 M (pH 1,9) que contenía 1 g/l de pepsina (P7012, Sigma-Aldrich, España), y se incubaron a 39,5°C durante una hora. Luego el pH se neutralizó con 0,5 ml de solución NaOH 1 M e inmediatamente después se añadieron 13,5 ml de una solución tampón fosfato de potasio 0,3 N (pH 7,75) que contenía 3 g/l de pancreatina (P7545, Sigma-Aldrich, España) y se incubó en un baño de agitación constante a 39,5°C durante 24 horas. Los tubos se agitaron vigorosamente cada 3-4 horas.

Transcurridas 24 horas, se sacaron los tubos del baño y se añadieron 3 ml de una solución de ácido tricloroacético para detener la digestión y precipitar las proteínas no degradadas. Diez minutos después, las muestras se centrifugaron a 10 000 × *g* durante

15 minutos a 4°C y, a continuación, se recogió el sobrenadante en tubos que se congelaron hasta su análisis posterior del contenido de nitrógeno soluble. Este análisis se realizó de forma similar al análisis de nitrógeno descrito para los alimentos o residuos de las incubaciones.

4. ANÁLISIS QUÍMICOS

4.1. Composición química de los alimentos o de los residuos de las incubaciones

El análisis químico convencional de los alimentos o de los residuos de las incubaciones se realizó en los laboratorios del IGM, los cuales están acreditados según la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 por la Entidad Nacional de Acreditación (Acreditación ENAC N.º 907/LE1609).

El contenido de MS se determinó por desecación en una estufa de ventilación forzada (P Selecta, España) a 103°C hasta peso constante (ISO 6496:1999). Posteriormente, la muestra seca se quemó en un horno mufla (12-PR/400, Hobersal; España) a 550°C durante 6 horas para determinar el contenido de cenizas (ISO 5984:2002).

Los análisis de nitrógeno (N) se efectuaron en un autoanalizador Kjeldahl (Foss Kjeltex™ 2400, Suecia), utilizando sulfato potásico y sulfato cúprico como catalizadores (ISO 5983-2:2009). El contenido de proteína bruta (PB) se obtuvo multiplicando el valor de N de cada muestra por el factor de conversión 6,25 ($PB = N \times 6,25$).

El contenido de FND y FAD se determinaron secuencialmente en un analizador Ankom²⁰⁰⁰ (Ankom Technology Corp., Estados Unidos), de acuerdo con la metodología descrita por Van Soest et al. (1991) y las adaptaciones realizadas por Ankom (<https://ankom.com>).

El contenido de extracto etéreo (EE) se analizó mediante el sistema Ankom (Ankom Filter Bag Technology) y la técnica descrita por la AOCS (2008).

4.2. Análisis de amoníaco

La concentración de amoníaco se determinó por colorimetría de acuerdo con el método del salicilato descrito por Reardon et al. (1966).

4.3. Análisis de taninos

El contenido de taninos totales en las 4 harinas de insectos y en la torta de soja se analizó mediante la técnica del Folin-Ciocalteu descrita por Makkar (2003). Primero se eliminaron los pigmentos y los compuestos lipídicos mediante lavados consecutivos con una solución de éter dietílico con un 1% de ácido acético. Posteriormente, el residuo se secó en una estufa de aire forzado a 40°C durante 2 horas y se realizaron dos extracciones consecutivas de los fenoles totales mediante la adición de 10 ml de acetona al 70% en cada una de ellas. A continuación, se tomó una alícuota de cada extracción para obtener un único extracto con el que se llevarían a cabo los análisis. En el caso de las harinas de insectos, se realizó una única extracción. Al extracto obtenido se le añadió el reactivo Folin-Ciocalteu y una solución de bicarbonato sódico al 20%. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro de doble haz (Shimadzu UV-1603, Japón) a 725 nm y la cantidad de fenoles totales se calculó a partir de una recta de calibración realizada con ácido tánico (1.59446.0010, Merck, Alemania) como estándar de referencia, por lo que los contenidos se expresan en equivalentes de este tanino (i. e., en equivalentes de ácido tánico). Para la determinación de los fenoles simples, el extracto que incluía los fenoles totales se sometió a un tratamiento con polivinilpirrolidona (PVPP; Sigma-Aldrich, España) para precipitar los taninos, de forma que los fenoles simples quedan en el sobrenadante. El contenido de estos fenoles se analizó como se ha explicado previamente para los fenoles totales. La diferencia entre los valores de fenoles antes y después del tratamiento con PVPP corresponde al contenido de taninos totales.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

5.1. Experimento 1. Valoración proteica

La determinación de la degradación ruminal del N de cada sustrato mediante la técnica *in vitro* basada en la incubación con cantidades crecientes de almidón se estimó mediante regresión lineal (ml de gas vs. mg de N-amoniaco/l), utilizando el procedimiento REG del paquete estadístico SAS (v9.4; SAS Inst. Inc., EE. UU.).

Los resultados se analizaron mediante dos análisis independientes de varianza, para estudiar las diferencias entre métodos (regresión, *in vitro* clásico e *in situ*) y entre sustratos (torta de soja y 4 harinas de insectos), utilizando en ambos casos (es decir,

tanto en el análisis de los métodos como en el de los sustratos) el procedimiento MIXED del SAS, de acuerdo con el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + X_i + \xi_{ij}$$

siendo:

Y_{ij} , la variable dependiente,

μ , la media,

X_i , dependiendo del modelo, el efecto fijo debido al método de estimación de la degradación del N (DN reg, DN *in vitro* y DN *in situ*) o al sustrato (harina de soja e insectos), y

ξ_{ij} , el error residual.

En ambos los casos, la tanda se consideró como efecto aleatorio y las medias se ajustaron para comparaciones múltiples usando la corrección de Bonferroni.

Se admitieron como diferencias estadísticamente significativas aquellas con un nivel de significación (P) inferior a $P < 0,05$, considerándose $P < 0,10$ una tendencia a la significación.

5.2. Experimento 2. Tratamiento con taninos

En este segundo experimento, y para cada sustrato, los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza utilizando el procedimiento MIXED del SAS, de acuerdo con el siguiente modelo estadístico:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \xi_{ij}$$

siendo:

Y_{ij} , la variable dependiente,

μ , la media,

T_i , el efecto fijo debido al tratamiento con taninos (control, roble o quebracho), y

ξ_{ij} , el error residual.

El animal se consideró como efecto aleatorio y las medias se ajustaron para comparaciones múltiples usando la corrección de Bonferroni.

Se admitieron como diferencias estadísticamente significativas aquellas con un nivel de significación (P) inferior a $P < 0,05$, considerándose $P < 0,10$ una tendencia a la significación.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ALIMENTOS

En la Tabla 2 se presentan los resultados de composición química de los alimentos estudiados: la torta de soja como alimento de referencia y las harinas de 4 tipos de insectos.

Tabla 2. Composición química (%) de los alimentos¹.

	MS	MO	PB	FND	FAD	EE	Almidón
Torta de soja	87,5	93,1	50,6	14,5	9,3	3,5	0,3
<i>Tenebrio molitor</i>	93,2	96,6	50,9	19,5	7,6	34,4	4,5
<i>Zophobas morio</i>	93,7	96,6	37,8	9,6	5,3	48,8	1,8
<i>Alphitobius diaperinus</i>	93,3	96,0	64,7	11,4	7,3	24,7	0,9
<i>Acheta domestica</i>	91,3	94,7	69,9	13,4	8,4	18,1	1,6

¹MS: materia seca; MO: materia orgánica; PB: proteína bruta; FND: fibra neutro detergente; FAD: fibra ácido detergente; EE: extracto etéreo.

Todos los resultados se expresan en % MS, excepto la propia MS que es % de la materia fresca.

Nuestros análisis confirman el potencial de las harinas de insectos como ingredientes alternativos a las fuentes tradicionales de proteína, más concretamente a la torta de soja. De los estudiados, *Z. morio* es el que mostró una menor cantidad de PB (38%), aunque mayor proporción de grasa (49%). El que mayor contenido proteico presentó fue *A. domestica* (70%), siendo en este caso su proporción de extracto etéreo claramente inferior (18%).

En general, la composición química observada es similar a la descrita por Rumpold y Schlüter (2013a) en un trabajo en el que estudiaron la composición nutricional y aspectos de seguridad de un buen número de insectos comestibles. En este artículo se destaca la elevada variabilidad observada en diferentes tipos de insectos, algo debido a las distintas especies de insectos utilizadas y a su estado de desarrollo, tal y como se ha indicado en otras publicaciones al respecto (e. g., Sánchez-Muros et al., 2014). Una revisión de la literatura confirma esta elevada variabilidad y, así, por ejemplo, los resultados de PB de *Z. morio* en la presente tesis fueron muy similares a los observados por Adámková et al. (2016), del 39% MS, mientras que Yi et al. (2013) habían mostrado contenidos del 52% y Finke (2015) de solo el 20%. Por su parte, los valores encontrados en *A. diaperinus* (65% MS) se situaron por encima del rango descrito en una revisión

sobre el tema (49-60%; Jonas-Levi y Martínez, 2017). En el caso de *A. domesticus*, su elevado porcentaje de PB (70%) es cercano al analizado por Yi et al. (2013), aunque existen informes que muestran resultados inferiores al 20% (Finke, 2015; Payne et al., 2016).

Además, hay que señalar también la riqueza de los insectos en ácidos grasos insaturados (Finke, 2002; Oonincx et al., 2015) y en diversos micronutrientes, a pesar de su deficiente contenido, por ejemplo, en calcio (Rumpold y Schlüter, 2013a; Makkar et al., 2014). No obstante, este tipo de análisis no se llevaron a cabo en nuestro estudio.

En la misma línea, también es de interés señalar que, con algunas excepciones, en general los insectos son deficientes en metionina y lisina, algo que debe ser tenido en cuenta a la hora de equilibrar las raciones (Makkar et al., 2014).

La mayor parte de la fibra de los insectos se debe a su exoesqueleto, es decir, a la quitina, siendo su contenido más alto, lógicamente, en los que se utilizan en su fase adulta. Jayanegara et al. (2017c) explican que la quitina sería insoluble en solución neutro detergente pero sí en la solución ácido detergente, aunque ellos mismos indican que esto necesitaría una confirmación.

En la Tabla 3 se muestran los resultados del análisis de taninos. Como puede comprobarse, la presencia de estos compuestos secundarios, al igual que la de fenoles totales, fue muy baja tanto en la torta de soja, como ya se sabía, como en las harinas de insectos.

Tabla 3. Contenido de fenoles totales y taninos totales de los alimentos (% MS).

	Fenoles totales	Taninos totales
Torta de soja	0,36	0,10
<i>Tenebrio molitor</i>	0,33	0,03
<i>Zophobas morio</i>	0,25	0,02
<i>Alphitobius diaperinus</i>	0,36	0,03
<i>Acheta domesticus</i>	0,37	0,07

Los resultados se expresan en equivalentes de ácido tánico.

El motivo para realizar este tipo de análisis, que a priori podría parecer extraño, es una conferencia organizada por la Academia de Ciencias Veterinarias de Castilla y León, en noviembre de 2018 en la Universidad de León. El tema versó sobre los insectos y tenía como título “¿Son los insectos un buen alimento? Seguridad alimentaria y valor nutricional”. En dicha conferencia, el profesor Dr. Carlos Alonso Calleja comentó que una de las características más especiales de los insectos era que algunas especies presentaban un contenido notable de taninos. Sin embargo, en la literatura científica solo hemos podido encontrar algunas referencias al contenido muy bajo de estos compuestos (Rumpold y Schlüter, 2013a). Así, por ejemplo, Ekop et al. (2010) los analizaron para conocer su posible efecto como antinutrientes. En línea con esto, nuestros resultados solo permiten apoyar esos niveles muy reducidos.

2. VALORACIÓN PROTEICA

A modo de recordatorio, en esta parte de la tesis se realizó una valoración proteica mediante el uso de 3 métodos diferentes: 1) la metodología *in vitro* basada en la estimación mediante regresión (DN reg), 2) el filtrado clásico tras la incubación *in vitro* (DN *in vitro*) y 3) la técnica *in situ* de las bolsas de nailon (DN *in situ*).

En cuanto al primer método, la degradación ruminal del N estimada por regresión, en la Tabla 4 se presentan las ecuaciones obtenidas a partir de los datos *in vitro* de producción de gas y el N amoniacal. La información se presenta también en la Figura 1.

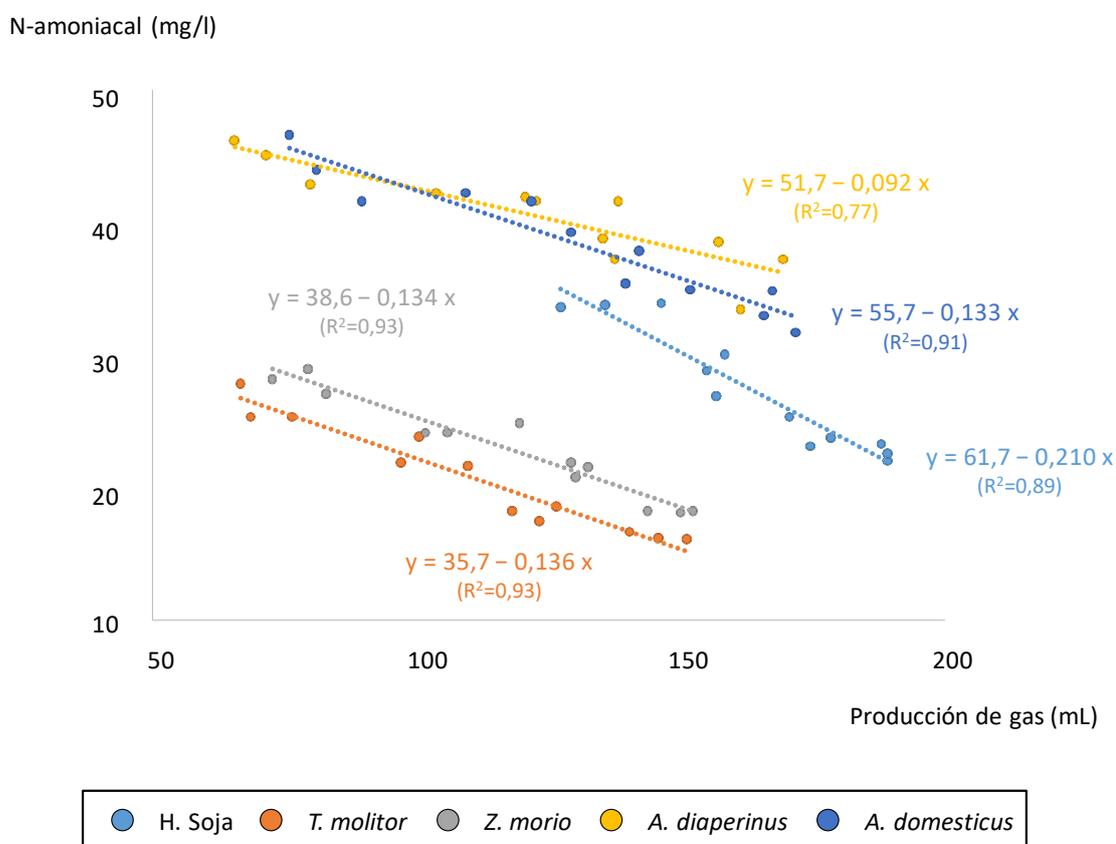
Tabla 4. Ecuaciones de regresión establecidas entre la producción de gas (x, mL) y el contenido de nitrógeno amoniacal (y, mg/l) tras 16 h de incubación *in vitro* de los alimentos proteicos con cantidades crecientes (0, 100, 200 o 300 mg) de almidón (n = 12).

	Ecuación de regresión	R ² -ajustada	RMSE ¹
Torta de soja	$y = 61,7 - 0,210 x$	0,893	1,5172
<i>Tenebrio molitor</i>	$y = 35,7 - 0,136 x$	0,927	1,1049
<i>Zophobas morio</i>	$y = 38,6 - 0,134 x$	0,933	0,9939
<i>Alphitobius diaperinus</i>	$y = 51,7 - 0,092 x$	0,768	1,7472
<i>Acheta domesticus</i>	$y = 55,7 - 0,133 x$	0,905	1,4489

¹Raíz cuadrada del error cuadrático medio.

En las ecuaciones, la intersección indica la degradación potencial de la PB (entre 52 y 62% para la soja, *A. diaperinus* y *A. domesticus*, y 36-38% para las larvas de *T. molitor* y *Z. morio*). No obstante, es conveniente señalar que estos resultados podrían estar condicionados por la composición del inóculo ruminal, obtenido de ovejas donantes que consumían una dieta muy rica en PB (~20%) y recogido 3-4 h post ingestión, lo que podría haber favorecido una elevada actividad proteolítica durante la incubación (Yáñez-Ruiz et al., 2016).

Figura 1. Representación gráfica de los datos mostrados en la Tabla 4.



En la Tabla 5 se muestran las diferencias debidas al método analítico y al sustrato. La degradación del N varió en función del método ($P < 0,05$) en 4 de los 5 sustratos y únicamente en *A. domesticus* fue similar entre técnicas ($P > 0,10$).

Independientemente del método, todos los insectos mostraron valores de degradación más bajos que los del alimento de referencia, algo sobre lo que no se disponía de información previa en la literatura.

La harina con valores más bajos de degradación del N fue la de *T. molitor*, lo cual se repitió consistentemente en todos los métodos ($P < 0,001$). El resto de insectos se situó en una posición intermedia (entre 0,556 y 0,778), con cifras relativamente similares cuando se estimó por regresión o *in situ*, pero más variables en la estimación *in vitro*, algo esperable dadas las características intrínsecas de cada método (Givens et al., 2000).

De hecho, la técnica de las bolsas de nailon (DN *in situ*) se ha utilizado en todo el mundo, por numerosos nutricionistas, para estudiar la degradación ruminal de la proteína. Sin embargo, la duda acerca de su sobreestimación de los resultados dista mucho de ser reciente (e. g., Givens et al., 2000; Mota et al., 2005). Esta sobreestimación estaría relacionada con el paso de pequeñas partículas a través de los poros de las bolsas, dándolas así por degradadas cuando en realidad no lo eran. También la técnica del filtrado en crisoles porosos tras la incubación *in vitro* (Williams, 2000) tiene problemas similares. En este último caso, además, la necesidad de raspar el crisol para obtener el residuo sobre el que analizar el contenido de N aporta un nuevo factor de variación que también puede alterar los resultados.

Tabla 5. Degradación (g/g) del nitrógeno de los alimentos proteicos estimado mediante el método de Raab et al. (1983; DN reg), el método *in vitro* de cultivos no renovados de microorganismos ruminales (DN *in vitro*) o la técnica de las bolsas de nailon (DN *in situ*).

	DN reg	DN <i>in vitro</i>	DN <i>in situ</i>	eed ¹	p ²
Torta de soja	1,141 ^{A/a}	0,853 ^{A/b}	0,914 ^{A/b}	0,0372	<0,001
<i>Tenebrio molitor</i>	0,498 ^{D/a}	0,406 ^{D/b}	0,486 ^{D/a}	0,0264	0,019
<i>Zophobas morio</i>	0,761 ^{B/a}	0,556 ^{C/b}	0,724 ^{BC/a}	0,0185	<0,001
<i>Alphitobius diaperinus</i>	0,701 ^{C/b}	0,699 ^{B/b}	0,778 ^{B/a}	0,0143	<0,001
<i>Acheta domesticus</i>	0,728 ^{BC}	0,715 ^B	0,702 ^C	0,0144	0,266
eed ¹	0,0118	0,0327	0,0202		
Prob. ²	<0,001	<0,001	<0,001		

^{ABCD} Para cada método, diferentes superíndices en la misma columna indican diferencias significativas.

^{ab} Para cada alimento, diferentes superíndices en la misma fila indican diferencias significativas.

¹Error estándar de la diferencia. ²Probabilidad.

Por otra parte, una de las principales críticas de la técnica *in vitro* (DN *in vitro*) es que puede infravalorar la degradación del N debido al incremento de este compuesto

asociado a la síntesis de microorganismos (i. e., proteína microbiana) durante el propio proceso de incubación *in vitro* (Hvelplund y Weisbjerg, 1998).

En nuestro estudio, los valores ilógicos en algunos casos de la DN obtenida mediante regresión (por ejemplo, el valor del 114% de degradación de la torta de soja) contribuirían a explicar por qué el método de Raab et al. (1983) no ha tenido una buena aceptación.

La necesidad de encontrar un método sencillo, rápido, barato y preciso para la valoración proteica, concretamente para determinar la degradación ruminal, de los alimentos para los rumiantes resulta obvia (Mota et al., 2005). A pesar de ello, los investigadores que trabajan en nutrición de rumiantes no han conseguido ponerse de acuerdo sobre el método más conveniente y, posiblemente, no exista un único método de elección, sino que este dependa de las características concretas de cada alimento o de cada estudio.

Por lo tanto, a modo de cierre de este apartado, podríamos indicar que nuestros resultados tampoco permiten seleccionar con fiabilidad un único valor de degradación ruminal del N. Sin embargo, los tres métodos utilizados sí parecen establecer un ranking similar entre los alimentos analizados.

Por otra parte, independientemente del método de valoración, los resultados sugieren que la proteína de los insectos analizados no presenta valores altos de degradación, siendo siempre inferiores a los de torta de soja. No obstante, es preciso realizar más trabajos de valoración proteica de estos alimentos alternativos porque continúa existiendo una importante escasez de información al respecto. En este sentido, sería necesario caracterizar qué parte del nitrógeno de los insectos está ligado a la fibra, ya que los análisis realizados no incluyeron esta determinación y una parte importante, al menos en las harinas obtenidas de insectos adultos, podría corresponder al nitrógeno presente en la quitina de la cutícula, lo que reduciría significativamente su utilización (Jonas-Levi y Martinez, 2017).

3. TRATAMIENTO CON TANINOS

A modo de breve recordatorio, esta segunda parte se llevó a cabo para investigar si el uso de taninos permitiría reducir la degradación ruminal de la proteína de las

harinas de insectos sin afectar a su digestibilidad intestinal, para así mejorar su utilización digestiva.

A estas alturas de la memoria, el objetivo puede resultar extraño tras haber llegado a la conclusión, en el Experimento 1, de que la proteína de los insectos valorados presentó valores de degradación relativamente bajos (siempre más bajos que los de la torta de soja). Ahora bien, hay que tener en cuenta que este resultado se desconocía cuando se planteó el estudio y cuando se realizaron las pruebas experimentales.

A los alimentos se les añadió un 15% de taninos de un extracto comercial de taninos de roble (ROB) o de quebracho (QUE), respondiendo la dosis a los resultados encontrados en sendos trabajos previos con extractos de quebracho (como representativo de los taninos condensados, Frutos et al., 2000) o de ácido tánico (como representativo de los taninos hidrolizables; Hervás et al., 2000).

En dichos trabajos, se comprobó que la dosis del 15% permitía reducir hasta un 20% la DN *in situ* de la torta de soja sin afectar a la digestibilidad intestinal cuando se trataba con quebracho (Frutos et al., 2000). En el caso del ácido tánico, la reducción de la DN *in situ* con el tratamiento que añadía un 15% de este producto se acompañaba de una caída en la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR; Hervás et al., 2000). Sin embargo, las características del ácido tánico hacen que este compuesto muestre a menudo un comportamiento más extremo que otros taninos (diferente incluso al de otros hidrolizables), por lo que en esta tesis se decidió mantener dicha dosis, confiando en que no afectara negativamente a la DIPNDR cuando se usara el extracto de taninos de roble.

Como puede observarse en la Tabla 6, el tratamiento de la torta de soja con taninos disminuyó la degradación de la proteína bruta (DPB) en comparación con lo observado en la torta no tratada. La reducción media fue del 15% y, aunque no hubo diferencias significativas entre ROB y QUE, el resultado de DPB fue numéricamente menor con el primer tratamiento, lo que contribuiría a explicar que este redujera además la DMS ($P < 0,05$), algo que no se detectó en el caso del quebracho.

Esta respuesta era previsible, dado el conocido efecto de los taninos protegiendo la proteína de la degradación ruminal y la efectividad de la dosis empleada para ello (Makkar, 2003; Mueller-Harvey, 2006; Dentinho et al., 2014).

Tabla 6. Degradación de la materia seca (DMS; g/g) y de la proteína bruta (DPB; g/g) tras 16 h de incubación ruminal y digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen (DIPNDR; g/g) de los alimentos tratados o no con un 15% de taninos hidrolizables (ROB: roble) o condensados (QUE: quebracho).

	Tratamiento			eed ¹	p ²
	Control	ROB	QUE		
Torta de soja					
DMS	0,893 ^a	0,790 ^b	0,837 ^{ab}	0,0278	0,017
DPB	0,914 ^a	0,736 ^b	0,812 ^b	0,0318	0,002
DIPNDR	0,680	0,721	0,644	0,0234	0,062
<i>Tenebrio molitor</i>					
DMS	0,654	0,632	0,643	0,0107	0,190
DPB	0,486 ^a	0,390 ^b	0,417 ^b	0,0094	<0,001
DIPNDR	0,782 ^{ab}	0,796 ^a	0,723 ^b	0,0234	0,028
<i>Zophobas morio</i>					
DMS	0,839 ^a	0,786 ^b	0,797 ^b	0,0126	0,005
DPB	0,724 ^a	0,574 ^b	0,596 ^b	0,0161	<0,001
DIPNDR	0,703 ^b	0,780 ^a	0,702 ^b	0,0157	0,001
<i>Alphitobius diaperinus</i>					
DMS	0,789 ^a	0,714 ^b	0,684 ^b	0,0146	<0,001
DPB	0,778 ^a	0,648 ^b	0,620 ^b	0,0176	<0,001
DIPNDR	0,640 ^b	0,780 ^a	0,645 ^b	0,0127	<0,001
<i>Acheta domesticus</i>					
DMS	0,702	0,679	0,680	0,0134	0,201
DPB	0,702 ^a	0,635 ^b	0,632 ^b	0,0145	0,003
DIPNDR	0,728 ^a	0,757 ^a	0,645 ^b	0,0242	0,005

^{ab} Para cada alimento y parámetro, diferentes superíndices indican diferencias significativas.

¹Error estándar de la diferencia. ²Probabilidad.

Con respecto a la dosis, es importante mencionar que 15 g de extracto de taninos por cada 100 g de alimento es la cantidad propuesta para tratar estos alimentos concretos (e. g., fuentes ricas en proteína), pero eso no quiere decir que el animal vaya a consumir un 15% de taninos en su dieta. Hay que tener en cuenta que el ingrediente estudiado entrará a formar parte de la dieta en una proporción de alrededor del 15 o 20%, lo que implica que el porcentaje de taninos consumido rondará el 2 o 2,5% de la ración. Estos valores se han demostrado efectivos para mejorar la utilización digestiva sin resultar tóxicos ni negativos para el animal (e. g., McSweeney et al., 1988; Frutos et al., 2004b; Mueller-Harvey, 2006).

Como se puede observar en la Tabla 7, una parte importante de la degradación, así como posteriormente de la protección gracias a los tratamientos con taninos, se deben a la solubilidad o a su efecto sobre ella.

Diversos trabajos han mostrado que el efecto de los taninos se ejerce principalmente mediante una acción negativa sobre la fracción inmediatamente degradable (que se estimaría en este caso con los datos de solubilidad, aunque no puede olvidarse lo señalado en el Experimento 1 acerca del paso de partículas a través de los poros de la bolsa sin ser realmente degradadas) y sobre el ritmo de degradación (Aharoni et al., 1998; Makkar, 2003; Hervás et al., 2000).

Respecto a la Tabla 7, en la que se muestran los datos de solubilidad, es importante señalar que, en varias ocasiones, tras la corrección de Bonferroni no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos, lo que explica que no aparezcan los superíndices esperados a partir de los niveles de significación (P).

Como se ha escrito más arriba, era esperable que la dosis utilizada no afectara negativamente a la digestibilidad intestinal de la proteína del alimento de referencia, es decir, de la torta de soja, aunque se ha mostrado que el uso de dosis más altas o de otros extractos de taninos podrían llegar a reducirla (Frutos et al., 2000; Hervás et al., 2000; Dentinho et al., 2014).

El valor de digestibilidad intestinal tendió a ser un 12% mayor en ROB que en QUE, pero sin que hubiera diferencias significativas respecto al control.

Tabla 7. Solubilidad (g/g) de los alimentos tratados o no con un 15% de taninos hidrolizables (ROB: roble) o condensados (QUE: quebracho).

	Tratamiento			eed ¹	p ²
	Control	ROB	QUE		
Torta de soja					
MS	0,323 ^b	0,366 ^a	0,360 ^a	0,0053	0,008
PB	0,232	0,170	0,174	0,0148	0,042
<i>Tenebrio molitor</i>					
MS	0,487 ^a	0,462 ^{ab}	0,431 ^b	0,0080	0,014
PB	0,290 ^a	0,229 ^b	0,218 ^b	0,0108	0,013
<i>Zophobas morio</i>					
MS	0,713 ^a	0,722 ^a	0,656 ^b	0,0090	0,010
PB	0,535 ^a	0,486 ^{ab}	0,438 ^b	0,0119	0,009
<i>Alphitobius diaperinus</i>					
MS	0,477	0,539	0,518	0,0143	0,048
PB	0,471	0,473	0,446	0,0107	0,154
<i>Acheta domesticus</i>					
MS	0,522	0,545	0,536	0,0048	0,039
PB	0,517 ^a	0,474 ^{ab}	0,470 ^b	0,0092	0,026

^{ab} Para cada alimento y parámetro, diferentes superíndices indican diferencias significativas.

¹ Error estándar de la diferencia. ² Probabilidad.

Los resultados de degradación de la proteína de las harinas de insectos siguieron el mismo patrón que los de DPB de la torta de soja, de forma que tanto el extracto de taninos de roble como el de taninos de quebracho redujeron su valor en todos los casos ($P < 0,05$). Los descensos variaron entre el 10% en el grillo doméstico (*Acheta domesticus*) y el 19% en el gusano rey (*Zophobas morio*), como puede observarse de manera más ilustrativa en la Figura 2.

No se observó una relación evidente entre la magnitud de la respuesta y los valores de PB inicial de cada insecto o de su DPB en el tratamiento control.

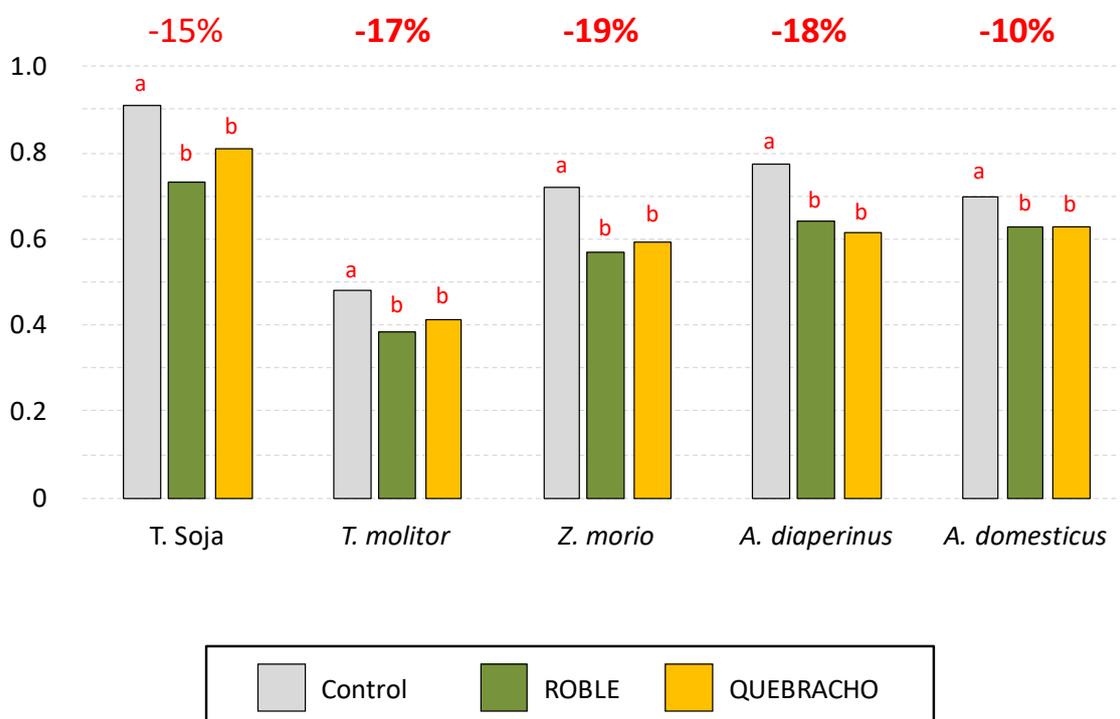
Como en el caso de la torta de soja, estas reducciones de la DPB también podrían explicar en parte la variación de la DMS en *Z. morio* y *A. diaperinus* (-6 y -11%,

respectivamente). Y también como en la torta de soja, la solubilidad fue responsable no solo de una parte importante de la DPB sino también de la acción de los taninos. En el caso de los insectos, es destacable los elevados valores de solubilidad observados en todo ello y, en especial en las muestras de *Z. morio*, donde se alcanzó el 71% de la MS y el 54% de la PB en los controles.

En relación con la menor degradación de la MS, sería interesante conocer si fue debida básicamente a la reducción de la degradación de la proteína o si otros componentes, como por ejemplo la fibra, se vieron también afectados, ya que los taninos no actúan únicamente sobre la proteína (McSweeney et al., 2001; Schofield et al., 2001; Makkar, 2003).

Hasta donde nosotros sabemos, no existen otros estudios publicados sobre la protección de la proteína de los insectos frente a la degradación ruminal que nos permitan hacer comparaciones con nuestros resultados.

Figura 2. Representación gráfica de los datos de DPB mostrados en la Tabla 6.



En cuanto a la digestibilidad intestinal de la proteína, alta en todas las harinas de insectos (ver Tabla 6), existe el mismo problema de falta de datos disponibles en la

literatura. Comparando con la torta de soja, Jayanegara et al. (2017a, 2017c) observaron una baja digestibilidad de la MS *in vitro* para varios insectos, incluyendo *T. molitor*, pero la técnica utilizada (Tilley y Terry, 1963) no permite discernir si estos resultados se explican por diferencias en la utilización ruminal de los sustratos o en la digestión posterior con pepsina, del mismo modo que resulta imposible determinar hasta qué punto están relacionados o no con la fracción proteica de los alimentos.

Tampoco existe información publicada sobre el tratamiento de harinas de insectos con taninos, de modo que su efecto solo puede compararse con el observado en alimentos de origen vegetal, por ejemplo, la torta de soja, sobre los cuales sí hay trabajos publicados.

Como se discutió para dicho alimento de referencia, los valores de DIPNDR fueron significativamente mayores en el tratamiento con el extracto de taninos de roble (ROB) que en el del quebracho (QUE) para los cuatro insectos ($P < 0,05$) y, sorprendentemente, también superiores que los del control para *Z. morio* y *A. diaperinus*.

Aunque trabajos previos habían mostrado reducciones o ausencia de efectos de los taninos sobre la digestibilidad intestinal (Hervás et al., 2000; Dentinho et al., 2014) y está muy generalizada la percepción de los efectos negativos de estos compuestos fenólicos (Mueller-Harvey, 2006), podría especularse que las diferencias entre ROB y QUE en la ruptura de los complejos tanino-proteína durante la incubación *in vitro* habrían contribuido a explicar nuestros resultados (Makkar, 2003). Además, se sabe que los taninos hidrolizables pueden ser parcialmente degradados en el rumen, motivo por el que algunos autores han explicado los efectos más limitados de este grupo de taninos en comparación con los taninos condensados (e. g., McSweeney et al., 2001).

En todo caso, aunque nuestros resultados sugieren que el uso de taninos de roble podría resultar más ventajoso que los de quebracho para mejorar la utilización digestiva de la proteína de los insectos, sería necesario realizar más experimentos para poder ratificarlo. También sería imprescindible llevar a cabo ensayos *in vivo* para confirmar dicho efecto, así como valorar el coste económico de uno y otro tipo de extractos.

También sería muy recomendable examinar la posibilidad de obtener efectos similares utilizando dosis más bajas o con taninos de menor pureza o de diferente

origen, con el objetivo final de reducir los costes en condiciones prácticas de explotación.

Por último, y aunque en esta tesis no se realizó ningún análisis al respecto, dado el contenido relativamente alto de grasa de algunos insectos y la información existente en la literatura acerca de su elevada proporción de ácidos grasos poliinsaturados, resultaría de gran interés estudiar el efecto potencial de estas estrategias nutricionales sobre el metabolismo lipídico en el rumen, al haberse demostrado un efecto positivo de algunos taninos sobre la acumulación ruminal de ciertos ácidos grasos deseables (e. g., de los ácidos oleico, vaccénico, linoleico o α -linolénico; Vasta et al., 2009a, 2009b; Carreño et al., 2015; Toral et al., 2018).

A modo de conclusión de este apartado, el tratamiento de las harinas de insectos con extractos comerciales de taninos de roble o de quebracho, a una dosis del 15%, resulta efectivo para proteger su proteína de la degradación ruminal. En lo que se refiere a la digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen, en algunos casos los taninos de roble resultaron más ventajosos que los de quebracho, aunque aún se requieren más estudios.

VI. CONCLUSIONES

Primera. Los diferentes métodos de valoración proteica utilizados (incubación *in situ* en bolsas de nailon, filtración tras incubación *in vitro*, y regresión entre producción de gas y amoniaco en incubaciones *in vitro*) no permiten seleccionar con fiabilidad un único valor de degradación ruminal del N para los alimentos analizados, aunque todos ellos parecen establecer un ranking similar. Así, independientemente de la técnica empleada, el nitrógeno de los insectos no presenta degradaciones altas, resultando siempre inferiores a las de la torta de soja (>85%). Los valores más bajos observados son los de *Tenebrio molitor* (41-50%, dependiendo del método), mientras que los de *Zophobas morio*, *Alphitobius diaperinus* y *Acheta domesticus* se sitúan en rangos intermedios (56-78%), con cifras similares en las estimaciones por regresión e *in situ*, pero más variables en la técnica *in vitro*.

Segunda. El tratamiento de las harinas de insectos con un 15% de taninos de roble o de quebracho resulta efectivo para la protección de su proteína frente a la degradación ruminal. En las condiciones de este estudio, los descensos variaron entre el 10% en *Acheta domesticus* y el 19% en *Zophobas morio*, pero sin que se observe una relación evidente entre la magnitud de la respuesta y los valores de proteína bruta inicial de cada insecto o de su degradación en el tratamiento control. La digestibilidad intestinal de la proteína no degradada en el rumen parece alta en todas las harinas de insectos (>64%), siendo además mayor en el tratamiento con el extracto de taninos de roble que en el del quebracho, lo que sugiere que el uso del primero podría resultar más ventajoso.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Adámková, A., Kouřimská, L., Borkovcová, M., Kulma, M., Mlček, J. 2016. Nutritional values of edible coleoptera (*Tenebrio molitor*, *Zophobas morio* and *Alphitobius diaperinus*) reared in the Czech Republic. *Potravinářstvo*, 10:663-671.
- Aharoni, Y., Gilboa, N., Silanikove N. 1998. Models of suppressive effect of tannins. Analysis of the suppressive effect of tannins on ruminal degradation by compartmental models. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 71:251-267.
- Alves, A.V., Sanjinez-Argandoña, E. J., Linzmeier, A. M., Lima, C. A., Rodríguez, M. L. 2016. Food value of mealworm grown on *Acrocomia aculeata* pulp flour. *Plos One*, 3:1-11.
- AOCS. 2008. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society, 5th ed. (2nd printing). AOCS. Urbana, Illinois (USA).
- Asquith, T.N., Butler, L.G. 1986. Interactions of condensed tannins with selected proteins. *Phytochemistry*, 25:1591-1593.
- Barker, D. 1995. Preliminary observations on nutrient composition differences between adult and pinhead crickets, *Acheta domestica*. *Nutrition Notes*, 7:10-13.
- Barroso, F.G., Sánchez-Muros, M.J., Segura, M., Morote, E., Torres, A., Ramos, R., Guil, J.L. 2017. Insects as food: Enrichment of larvae of *Hermetia illucens* with omega 3 fatty acids by means of dietary modifications. *J. Food Compos. Anal.*, 62:8-13.
- Boloh, Y. 2018. Insect proteins inch toward approval for EU animal feed. *Feed Strategy.*, 69:16-18.
- Calsamiglia, S., Stern, M.D. 1995. A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein. *J. Anim. Sci.*, 73:1459-1465.
- Carreño, D., Hervás, G., Toral, P.G., Belenguer, A., Frutos, P. 2015. Ability of different types and doses of tannin extracts to modulate *in vitro* ruminal biohydrogenation in sheep. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 202:42-51.
- Cecco, L., González, H., Deluchi, P., Barrios, H., de Franceschi M. 2005. Determinación de los estados de desarrollo de *Alphitobius diaperinus* en granjas avícolas. *Rev. Argent. Prod. Animal*, 25:93-99.
- Dentinho, M.T.P., Belo, A.T., Bessa, R.J.B. 2014. Digestion, ruminal fermentation and microbial nitrogen supply in sheep fed soybean meal treated with *Cistus ladanifer* l. tannins. *Small Rumin. Res.*, 119:57-64.
- Dinev, I. 2013. The darkling beetle (*Alphitobius diaperinus*). A health hazard for broiler chicken production. *Trakia J. Sci.*, 11:1-4.
- Doce, R.R. 2010. Consumo de hojas jóvenes de roble (*Quercus pyrenaica*) por el ganado vacuno: Aspectos nutricionales e intoxicación. Tesis doctoral. Universidad de León (León).
- EFSA. 2015. Risk profile related to production and consumption of insects as food and feed. *EFSA J.*, 13:4257.
- Ekop, E.A., Udoh, A.I., Akpan, P.E. 2010. Proximate and antinutrient composition of four edible insects in Akwa Ibom State, Nigeria. *World J. Appl. Sci. Technol.*, 2:224-231.
- FAO. 2018. The future of food and agriculture. Alternative pathways to 2050. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome (Italy).
- Finke, M.D. 2005. Nutrient content of insects. Pp. 1563-1575 in: *Encyclopedia of Entomology*. Springer (Netherlands).

- Finke, M.D. 2002. Complete nutrient composition of commercially raised invertebrates used as food for insectivores. *Zoo Biol.*, 21:269-285.
- Finke, M.D. 2015. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biol.*, 34:554-564.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., Fernández, M., Mantecón, A.R. 2000. Digestive utilization of quebracho treated soya bean meals in sheep. *J. Agric. Sci.*, 134:101-108.
- Frutos, P., Hervás, G., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R. 2004a. Review: Tannins and ruminant nutrition. Tannins: structure and chemical. *Span. J. Agric. Res.*, 2:191-202.
- Frutos, P., Raso, M., Hervás, G., Mantecón, A.R., Pérez, V., Giráldez, F.J. 2004b. Is there any detrimental effect when a chestnut hydrolysable tannin extract is included in the diet of finishing lambs? *Anim. Res.*, 53:127-136.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 1998. The *in vitro* gas coupled with ammonia measurements for evaluation of nitrogen degradability in low quality roughages using incubation medium of different buffering capacity. *J. Sci. Food Agric.*, 77:87-95.
- Getachew, G., Makkar, H.P.S., Becker, K. 2000. Effect of polyethylene glycol on *in vitro* degradability of nitrogen and microbial protein synthesis from tannin-rich browse and herbaceous legumes. *Br. J. Nutr.*, 84:73-83.
- Ghaly, A.E., Alkoaik, F.N. 2009. The yellow mealworm as a novel source of protein. *Am. J. Agric. Biolog. Sci.*, 4:319-331.
- Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M. 2000. Forage evaluation in ruminant nutrition. CABI Publishing, Wallingford (United Kingdom).
- Goering, H.K., Van Soest, P.J. 1970. Forage fiber analyses (Apparatus, Reagents, Procedures and Some Applications). *Agric. Handbook No. 379*. ARS-USDA, Washington (USA).
- Gosh, S., Lee, S., Jung, C., Meyer-Rochow, V.B. 2017. Nutritional composition of five commercial edible insects in South Korea. *J. Asia-Pac. Entom.*, 20:686-694.
- Hervás, G. 2001. Los taninos condensados de quebracho en la nutrición de las ovejas. Efecto sobre la fermentación en el rumen y la digestibilidad, toxicidad y utilización como protectores frente a la degradación ruminal. Tesis doctoral. Universidad de León (León).
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F.J., Mantecón, A.R., Álvarez del Pino, C. 2003. Effect of different doses of quebracho tannins extract on rumen fermentation in ewes. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 109:65-78.
- Hervás, G., Frutos, P., Giráldez, F.J., Mora, M.J., Fernández, B., Mantecón, A.R. 2005. Effect of preservation on fermentative activity of rumen fluid inoculum for *in vitro* gas production techniques. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123:107-118.
- Hervás, G., Frutos, P., Serrano, E., Mantecón, A.R., Giráldez, F.J. 2000. Effect of tannic acid on rumen degradation and intestinal digestion of treated soya bean meals in sheep. *J. Agric. Sci.*, 135:305-310.
- Hvelplund, T., Madsen, J. 1993. Protein systems for ruminants. *Icel. Agr. Sci.*, 7:21-36.
- Hvelplund, T., Weisbjerg, M.R. 1998. *In vitro* techniques to replace *in vivo* methods for estimating amino acid supply. Pp. 131-144 in: Deaville, E.R., Owen, E., Adesogan, A.T., Rymer, C., Huntington, J.A., Lawrence, T.L.J. (Eds.). *In vitro* techniques for measuring nutrient supply to ruminants. BSAS, Reading (United Kingdom).
- INRA. 2007. Alimentation des bovins, ovins et caprins. Besoins des Animaux: Valeur des aliments. Tables INRA 2007. INRA, Versailles (France).

- Jabir, M.D.A.R., Razak, S.A., Vikineswary, S. 2012. Chemical composition and nutrient digestibility of super worm meal in red tilapia juvenile. Pak. Vet. J., 32:489-493.
- Janssen, R.H., Vincken, J.P., van den Broek, L.A., Fogliano, V., Lakemond, C.M. 2017. Nitrogen to protein conversion factors for three edible insects: *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, and *Hermetia illucens*. J. Agric. Food Chem., 65:2275-2278.
- Jayanegara, A., Novandri, B., Yantina, M., Ridla, M. 2017a. Use of black soldier fly larvae (*Hermetia illucens*) to substitute soybean meal in ruminant diet: An *in vitro* rumen fermentation study. Vet. World 10:1436-1446.
- Jayanegara, A., Sholikin, M.M., Sabila, D.A.N., Suharti, S., Astuti, D.A. 2017b. Lowering chitin content of cricket (*Gryllus assimilis*) through exoskeleton removal and chemical extraction and its utilization as a ruminant feed *in vitro*. Pak. J. Biol. Sci., 20:523-529.
- Jayanegara, A., Yantina, N., Novandri, B., Laconi, E.B., Nahrowi, N., Ridla, M. 2017c. Evaluation of some insects as potential feed ingredients for ruminants: chemical composition, *in vitro* rumen fermentation and methane emissions. J. Indones. Trop. Anim. Agric. 42:247.
- Jonas-Levi, A., Martinez, J.J.I. 2017. The high level of protein content reported in insects for food and feed is overestimated. J. Food Comp. Anal., 62:184-188.
- Jones, G.A., McAllister, T.A., Muir, A.D., Cheng, K.J. 1994. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia Scop*) condensed tannins on growth and proteolysis by 4 strains of ruminal bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 60:1374-1378.
- Khanbabaee, K., van Ree, T. 2001. Tannins: Classification and definition. Nat. Prod. Rep., 18:641-649.
- Lupi, O. 2006. Myiasis as a risk factor for prion diseases in humans. J. Europ. Acad. Dermat. Venereolog., 20:1037-1045.
- Madsen, J., Hvelplund, T. 1994 Prediction of *in situ* protein degradability in the rumen. Results of a European ringtest. Livest. Prod. Sci., 39:201-212.
- Makkar, H.P.S. 2003. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin rich feeds. Small Rumin. Res., 49:241-256.
- Makkar, H.P.S., Tran, G., Heuzé, V., Ankers, P. 2014. State of the art on use of insects as animal feed. Anim. Feed Sci. Technol., 197:1-33.
- Mavromichalis, I. 2018. 6 alternative protein sources to soybean meal. Feed Strategy, 69:10-15.
- McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan C.A. 2006. Nutrición Animal. 6ª edición. Editorial Acribia, Zaragoza (España).
- McLeod, M.N. 1974. Plant tannins: Their role in forage quality. Nutr. Abstr. Rev., 44:803-812.
- McMahon, L.R., McAllister, T.A., Berg, B.P., Majak, W., Acharya, S.N., Popp, J.D., Coulman, B.E., Wang, Y., Cheng, K.J. 2000. A review of the effects of forage condensed tannins on ruminal fermentation and bloat in grazing cattle. Can. J. Plant Sci., 80:469-485.
- McSweeney C.S., Kennedy P.M., John, A. 1988. Effect of ingestion of hydrolysable tannins in *Terminalia oblongata* on digestion in sheep fed *Stylosanthes hamata*. Aust. J. Anim. Sci., 39:235-244.
- McSweeney, C.S., Palmer, B., McNeill, D.M., Krause, D.O. 2001. Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants. Anim. Feed Sci. Technol., 91:83-93.

- Mota, M., Rodríguez, R., Solanas, E., Fondevila, M. 2005. Evaluation of four tropical browse legumes as nitrogen sources: Comparison of *in vitro* gas production with other methods to determine N degradability. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 123:341-350.
- Mueller-Harvey, I. 2006. Review: Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.*, 86:2010-2037.
- Mueller-Harvey, I., Bee, G., Dohme-Meier, F., Hoste, H., Karonen, M., Kölliker, R., Lüscher, A., Niderkorn, V., Pellikaan, W.F., Salminen, J.P., Skøt, L., Smith, L.M.J., Thamsborg, S.M., Totterdell, P., Wilkinson, I., Williams, B. N. Azuhwi, N. Baert, A. G. Brinkhaus, G. Copani, O. Desrues, C. Drake, M. Engström, C. Frygas, A.R., Girard, M., Huyen, N.T., Kempf, K., Malisch, C., Mora-Ortiz, M., Quijada, J., Ramsay, A., Ropiak, H.M., Waghorn, G.C. 2019. Benefits of condensed tannins in forage legumes fed to ruminants: Importance of structure, concentration and diet composition. *Crop Sci.*, 59:861-885.
- Nakagaki, B.J., Sunde, M.L., DeFoliart, G.R. 1987. Protein quality of the house cricket, *Acheta domesticus*, when fed to broiler chicks. *Poult. Sci.*, 66:1367-1371.
- Nocek, J.E. 1988 *In situ* and other methods to estimate ruminal protein and energy digestibility: a review. *J. Dairy Sci.*, 71:2051-2069.
- Oonincx, D.G.A.B., van Broekhoven, S., van Huis, A., van Loon, J.J.A. 2015. Feed conversion, survival, development and composition of four insect species on diets composed of food by-products. *Plos One*, 10:1-20.
- Ørskov. E.R., DeB Hovell, F.D., Mould, F. 1980. The use of the nylon bag technique for the evaluation of feedstuffs. *Trop. Anim. Prod.*, 5:195-213.
- Ørskov. E.R., McDonald, I. 1979. The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. *J. Agric. Sci.*, 92:499-503.
- Payne, C.L.R., Scarborough, P., Rayner, M., Nonaka, K. 2016. A systematic review of nutrient composition data available for twelve commercially available edible insects, and comparison with reference values. *Trends Food Sci. Technol.*, 47:69-77.
- Pell, A.N., Schofield, P. 1993. Computerized monitoring of gas production to measure forage digestion *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 76:1063-1073.
- Premalatha, M., Abbasi, T., Abbasi, T., Abbasi, S.A. 2011. Energy efficient food production to reduce global warming and ecodegradation: The use of edible insects. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, 15:4357-4360.
- PROteinSECT. 2016. Insect protein: Feed for the future. Addressing the need for feeds of the future today. White paper 2016] URL: http://www.proteinsect.eu/fileadmin/user_upload/press/proteinsect-whitepaper-2016.pdf [acceso 03/06/2019]
- Raab, L., Cafantaris, B., Jilg, T., Menke, K.H. 1983. Rumen protein degradation and biosynthesis. *Br. J. Nutr.*, 50:569-582.
- Ramos-Elorduy, J., Ávila-González, E., Rocha-Hernández, A., Pino, J.M. 2002. Use of *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae) to recycle organic wastes and as feed for broiler chickens. *J. Econ. Entomol.*, 95:214-220.
- Ramos-Elorduy, J., Pino-Moreno, J.M., Angeles-Campos, S., García-Pérez, A. 2012. Análisis comparativo del valor nutritivo de *Zophobas morio fabricius* 1776, y su uso actual en la alimentación de animales de compañía. Págs. 977-980. XLVII Congreso Nacional de Entomología y Primer Congreso Latinoamericano de Acarología. 20-23 de mayo de 2012. Puebla (México).

- Rashmi, K.M., Chandrasekharaiah, M., Soren, N.M., Prasad, K.S., David, C.G., Thirupathaiah, V., Shivaprasad, V. 2018. Effect of dietary incorporation of silkworm pupae meal on *in vitro* rumen fermentation and digestibility. *Indian J. Anim. Sci.*, 88:731-735.
- Reardon, J., Foreman, J.A., Searcy, R.L. 1966. New reactants for the colorimetric determination of ammonia. *Clin. Chim.*, 14:403-405.
- Rumpold, B.A., Schlüter, O.K. 2013a. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. *Mol. Nutr. Food Res.*, 57:802-823.
- Rumpold, B.A., Schlüter, O.K. 2013b. Potential and challenges of insects as an innovative source for food and feed production. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 17:1-11.
- Sánchez-Muros, M.J., Barroso, F.G., Manzano-Agugliaro, F. 2014. Insect meal as renewable source of food for animal feeding: A review. *J. Clean. Prod.*, 65:16-27.
- Schofield, P., Mbugua, D.M., Pell, A.N. 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 91:21-40.
- Schulte, R. 1996. El manejo de *Zophobas morio* (Coleoptera Tenebrionidae) en climas tropicales húmedos. *Folia Amazónica*, 8:47-75.
- Sheikh, I., Banday, M., Baba, I., Adil, S., Nissa, S.S., Zaffer, B., Bulbul, K. 2018. Utilization of silkworm pupae meal as an alternative source of protein in the diet of livestock and poultry: A review. *J. Entomol. Zool. Studies*, 6:1010-1016.
- Smith, P., Gregory, P.J. 2013. Conference: Future food and health. Symposium I: Sustainability and food security climate change and sustainable food production. *Proc. Nutr. Soc.*, 72:21-28.
- Tamminga, S. 1979. Protein degradation in the forestomachs of ruminants. *J. Anim. Sci.*, 49:1615-1630.
- Tilley, J.M.A., Terry, R.A. 1963. A two-stage technique for the *in vitro* digestion of forage crops. *Grass Forage Sci.*, 18:104-111.
- Toral, P.G., Monahan, F.J., Hervás, G., Frutos, P., Moloney, A.P. 2018. Review: Modulating ruminal lipid metabolism to improve the fatty acid composition of meat and milk. Challenges and opportunities. *Animal*, 12:272-281.
- Van Huis, A., Itterbeeck, J.V., Klunder, H., Mertens, E., Halloran, A., Muir, G., Vantomme, P. 2013. Edible insects. Future prospects for food and feed security. Food and Agriculture Organization of the United Nations Forestry Paper 171, Rome (Italy).
- Van Huis, A. 2019. Manure and flies: Biodegradation and/or bioconversion? *J. Insects Food Feed*, 5:55-58.
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.*, 74:3583-3597.
- Vanzant, E.S., Cochran, R.C., Titgemeyer, E.C. 1998. Standardization of *in situ* techniques for ruminant feedstuff evaluation. *J. Anim. Sci.*, 76:2717-2729.
- Vasta, V., Makkar, H.P.S., Mele, M., Priolo, A. 2009a. Ruminal biohydrogenation as affected by tannins *in vitro*. *Br. J. Nutr.*, 102:82-92.
- Vasta, V., Mele, M., Serra, A., Scerra, M., Luciano, G., Lanza, M., Priolo, A. 2009b. Metabolic fate of fatty acids involved in ruminal biohydrogenation in sheep fed concentrate or herbage with or without tannins. *J. Anim. Sci.*, 87:2674-2684.

- Waghorn, G. 1996. Condensed tannins and nutrient absorption from the small intestine. Proc. Can. Soc. Anim. Sci., 175-194.
- Wild, K.J., Steingäß, H., Rodehutschord, M. 2019. Variability of *in vitro* ruminal fermentation and nutritional value of cell-disrupted and nondisrupted microalgae for ruminants. GCB Bioenergy, 11:345-359.
- Williams, B.A. 2000. Cumulative gas production techniques for forage evaluation. Pp. 189-213 in: Givens, D.I., Owen, E., Axford, R.F.E., Omed, H.M. (Eds.). Forage Evaluation in Ruminant Nutrition. CABI Publishing. Wallingford (United Kingdom).
- Yáñez-Ruiz, D.R., Bannik, A., Dijkstra, J., Kebreab, E., Morgavi, D.P., O'Kiely, P., Reynolds, C.K., Schwarm, A., Shingfield, K.J., Yu, Z., Hristov, A.N. 2016. Design, implementation and interpretation of *in vitro* batch culture experiments to assess enteric methane mitigation in ruminants. A review. Anim. Feed Sci. Technol., 216:1-18.
- Yi, L., Lakemond, C.M.M., Sagis, L.M.C., Eisner-Schadler, V., van Huis, A., van Boekel, M.A.J.S. 2013. Extraction and characterization of protein fractions from five insect species. Food Chem., 141:3341-3348.